

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Mari-Liis Reim

**Inimese tiopuriinmetüültransferaasi aktiivsust mõjutavad faktorid
maksas**

Magistritöö

Juhendajad: Riin Tamm, M.Sc.
Lili Milani, Ph.D.
prof. Andres Metspalu, M.D., Ph.D.

TARTU 2013

SISUKORD

| | |
|---|----|
| LÜHENDID..... | 3 |
| SISSEJUHATUS..... | 5 |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE..... | 7 |
| 1.1 <i>Geneetiline varieeruvus ravimeid metaboliseerivates geenides</i> | 7 |
| 1.2 <i>Epigeneetika</i> | 9 |
| 1.2.1 DNA metüleerimine..... | 9 |
| 1.2.1.1 DNA metülatsiooni mõju geeniekspressioonile..... | 10 |
| 1.2.1.2 DNA metüültransferaasid..... | 11 |
| 1.2.2 Kromatiini struktuur..... | 12 |
| 1.2.3 Histoonide modifikatsioonid..... | 13 |
| 1.2.4 Epigeneetika tähtsus..... | 15 |
| 1.3 <i>Tiopuriinmetüültransferaas</i> | 16 |
| 1.3.1 Tiopuriinmetüültransferaasi geen ja valk..... | 16 |
| 1.3.2 TPMT polümorfism..... | 17 |
| 1.3.3 TPMT ensüümiaktiivsus..... | 18 |
| 1.4 <i>Puriini analoogid ja nende metabolism</i> | 20 |
| 1.4.1 TPMT vahendatud metülatsiooni kliiniline tähtsus..... | 23 |
| 1.5 <i>Äge lümfoidne leukeemia</i> | 24 |
| 1.6 <i>Põletikulised soolehaigused</i> | 25 |
| 1.6.1 Haavandiline koliit..... | 26 |
| 1.6.2 Crohni tõbi..... | 27 |
| 2. EKSPERIMENTAALOSA..... | 28 |
| 2.1 <i>Töö eesmärgid</i> | 28 |
| 2.2 <i>Materjalid ja meetodika</i> | 28 |
| 2.2.1 Valim..... | 28 |
| 2.2.2 Ensüümiaktiivsuse määramine maksast kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (High-performance liquid chromatography HPLC) meetodiga..... | 28 |
| 2.2.2.1 Aparatuur..... | 29 |
| 2.2.2.2 Eluendi ja lahuste valmistamine..... | 29 |
| 2.2.2.3 Valgu lisaadi valmistamine..... | 30 |
| 2.2.2.4 Valgu kontsentratsiooni mõõtmine tsütosoolist..... | 30 |
| 2.2.2.5 Proovi ettevalmistamine inkubeerimiseks TPMT substraadi 6-MP-ga..... | 31 |
| 2.2.2.6 HPLC tingimused 6-MP ja 6-MMP määramiseks..... | 31 |
| 2.2.3 DNA metülatsiooni analüüs <i>Infinium HumanMethylation450 BeadChip</i> metülatsioonikiibiga..... | 32 |
| 2.2.4 Polümorfimide genotüpiseerimine..... | 33 |
| 2.3 <i>Tulemused ja arutelu</i> | 34 |
| 2.3.1 Tulemused..... | 34 |
| 2.3.1.1 Ensüümiaktiivsuse mõõtmine HPLC-ga..... | 34 |
| 2.3.1.2 Genotüpiseerimine..... | 35 |
| 2.3.1.3 Genotüüpide seos ensüümiaktiivsusega..... | 37 |
| 2.3.1.4 CpG saitide metülatsioonimustri profileerimine..... | 38 |
| 2.3.1.5 CpG saitide metülatsiooni seos TPMT aktiivsuse ja genotüübiga..... | 39 |
| 2.3.2 Arutelu..... | 40 |
| KOKKUVÕTE..... | 45 |
| SUMMARY..... | 46 |
| TÄNUAVALDUSED..... | 48 |
| KASUTATUD KIRJANDUS..... | 49 |
| KASUTATUD VEEBIAADRESSID..... | 58 |
| LISAD..... | 59 |

LÜHENDID

| | |
|---------|--|
| 3'-UTR | 3' transleerimata piirkond, <i>3' untranslated region</i> |
| 5'-UTR | 5' transleerimata piirkond, <i>5' untranslated region</i> |
| 6-MeMP | 6-metüleeritud merkaptopuriin, <i>6-methylated mercaptopurine</i> |
| 6-MP | 6-merkaptopuriin, <i>6-mercaptopurine</i> |
| 6-TG | 6-tioguaaniin, <i>6-thioguanine</i> |
| 6-TGN | Tioguaaniinnukleotiidid, <i>thioguanine nucleotides</i> |
| ACN | Atsetonitril, <i>acetonitrile</i> |
| ALL | Äge lümfoidne leukeemia, <i>acute lymphoblastic leukemia</i> |
| AO | Aldehüdoksüdaas, <i>aldehyde oxidase</i> |
| AZA | Asatiopriin, <i>azathioprine</i> |
| BHMT | Betaiin-homotsüsteiini metüültransferaas, <i>betaine-homocysteine methyltransferase</i> |
| CpG | Tsütosiin-guaaniin dinukleotiid, <i>cytosine and guanine dinucleotide</i> |
| CPM | Loenduste arv minutis, <i>counts per minute</i> |
| DME | Ravimeid metaboliseerivad ensüümid, <i>drug metabolizing enzymes</i> |
| DMSO | Dimetüülsulfoksiid, <i>dimethyl sulfoxide</i> |
| DNMT1-3 | DNA metüültransferaasid, <i>DNA methyltransferase</i> |
| DPD | Dihüdropürimidiini dehüdrogenaas, <i>dihydropyrimidine dehydrogenase</i> |
| dTGTP | Desoksü-6-tioguaansiin-5'-trifosfaat, <i>deoxythioguanine triphosphate</i> |
| DTT | Ditiotreitool, <i>dithiothreitol</i> |
| FDR | Valeavastuste määr, <i>false discovery rate</i> |
| GMPS | Guaansiin monofosfaadi süntetaas, <i>guanine monphosphate synthetase</i> |
| H1 | Histoon H1, <i>histone H1</i> |
| H2A-H2B | Histoonid H2A ja H2B, <i>histone H2A and histone H2b</i> |
| H3-H4 | Histoonid H3 ja H4, <i>histone H3 and histone H4</i> |
| Hcy | Homotsüsteiin, <i>homocysteine</i> |
| HDAC | Histooni deatsetülaas, <i>histone deacetylases</i> |
| HGPRT | Hüpoksantiinguaaniin-fosforibosüültransferaas, <i>hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i> |
| HPLC | Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia, <i>high-perfomance liquid chromatography</i> |
| IBD | Põletikulised soolehaigused, <i>inflammatory bowel diseases</i> |
| IMPDH | Inosiin monofosfaadi dehüdrogenaas, <i>inosine-5'-monophosphate dehydrogenase</i> |
| K | Lüsiin, <i>lysine</i> |
| MeCP2 | Metüleeritud DNA-d siduv valk 2, <i>methyl CpG binding protein 2</i> |
| MeOH | Metanool, <i>methanol</i> |
| meTIMP | Metüleeritud 6-tioinosiin-5'-monofosfaat, <i>methylated 6-thioinosine 5'-monophosphate</i> |

| | |
|-------|---|
| MTHFR | 5,10-metüleentetrahüdrofolaadi reduktaas, <i>methylenetetrahydrofolate reductase</i> |
| MTX | Metotrekstaat, <i>methotrexate</i> |
| PPAT | Fosforibosüülpürofosfaadi aminotransferaas, <i>phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase</i> |
| PRPP | Fosforibosüülpürofosfaat, <i>phosphoribosyl pyrophosphate</i> |
| R | Arginiin, <i>arginine</i> |
| RBC | Punased vererakud, <i>red blood cells</i> |
| RCF | Redutseeriud folaadi kandja, <i>reduced folate carrier</i> |
| SAH | S-adenosüül-L-homotsüsteiin, <i>S-Adenosyl-L-homocysteine</i> |
| SAM | S-adenosüül-L-metioniin, <i>S-Adenosyl methionine</i> |
| SUMO | Ubikvitiini sarnased modifitseerijad, <i>small ubiquitin-related modifier</i> |
| TF | Transkriptsioonifaktor, <i>transcription factor</i> |
| TGDP | 6-tioguanosiin-5'-difosfaat, <i>thioguanine diphosphate</i> |
| TGMP | 6-tioguanosiin-5'-monofosfaat, <i>6-thioguanosine 5'-monophosphate</i> |
| TGTP | Tioguanosiin-5'-trifosfaat, <i>thioguanine triphosphate</i> |
| TIMP | 6-tioinosiin-5'-monofosfaat, <i>6-thioinosine 5'-monophosphate</i> |
| TPMT | Tiopuriinmetüültransferaas, <i>thiopurine methyltransferase</i> |
| TSS | Transkriptsiooni alguspunkt, <i>transcription start site</i> |
| TUA | Tiouuraat, <i>thiouric acid</i> |
| TYMS | Tümidülaadi süntaas, <i>thymidylate synthase</i> |
| U | Ühik, <i>unit</i> |
| VNTR | Varieeruva arvuga tandeemsed kordusjärjestused, <i>variable number tandem repeats</i> |
| XO | Ksantiinoksüdaas, <i>xanthine oxidase</i> |

SISSEJUHATUS

Varieeruva ravimivastuse kujunemisele annavad panuse mitmed faktorid, nende hulgas indiviidi vanus, kehamassiindeks, populatsiooniline päritolu, sugu, koostoimed teiste samaaegselt manustatavate ravimitega, haiguse olemus, keskkonnafaktorid ning patsiendi üldine tervislik seisund. Kuid väga olulist rolli mängib ka inimese genoomi normaalsest varieeruvustest põhjustatud geneetiline erinevus, mis mõjutab ravimivastuse kujunemist indiviiditi (Evans ja McLeod, 2003; Crews jt., 2012).

Ravimiannuseid võib liigitada mittetoimivateks, toimivateks ehk terapeutilisteks ning toksilisteks. Ühel avaldub ravimi terapeutiline toime standarddoosi korral, teistel võib aga tavapärase ravimiannuse manustamine põhjustada kõrvalnähte ja toksilisust. Farmakogeneetika üheks eesmärgiks on ravimite mõju avaldumist ja haiguste kulgu mõjutavate geneetiliste markerite tuvastamine. Teades inimeste haiguse olemust, ravi efektiivsust mõjutavaid faktoreid ning nende geneetilisi iseärasusi, on võimalik määrata igale indiviidile optimaalne terapeutiline ravim ja ravimidoos, mis tagaks maksimaalse ravitulemuse.

Kliinilises praktikas kasutatakse ägeda lümfoidse leukeemia (*acute lymphoblastic leukemia*, ALL) raviks tiopuriinravimeid, mida manustatakse ka põletikuliste soolehaiguste ravis (*inflammatory bowel diseases*, IBD).

Tiopuriinmetüültransferaas (*thiopurine methyltransferase*, TPMT) on tsütoplasma ensüüm. TPMT kaudu metaboliseerudes moodustuvad tiopuriinravimite inaktiivsed metaboliidid, mis väljutatakse organismist uriiniga. Muutused TPMT geenis põhjustavad individuaalseid erinevusi ravimite taluvuses ja efektiivsuses (Weinshilboum ja Sladek, 1980). Ensüümiaktiivsuse langus põhjustab ravimi aktiivsete metaboliitide kuhjumist organismi, mis omakorda võib patsientidel tekitada eluohtlikke ravimikõrvalnähte (Lennard jt., 1987). Tiopuriinravimite põhjustatud toksilisuse vältimiseks on soovitatav teostada enne ravi alustamist patsientide genotüpiseerimine või määrata TPMT aktiivsust.

Hoolimata mitmete farmakogeneetiliste markerite tuvastamisest, on farmakogeneetikal põhinev diagnostika tänapäeval rakendatav vaid väikesele osale ravimitele (Chua ja Kennedy, 2012). Esmane entusiasmi farmakogeneetika rakendamisest kliinilises praktikas on asendunud teadmisega, et ravimite metabolism ei sõltu reeglina ainult ühest kindlast ensüümist, vaid keerulisest metaboolsest võrgustikust, milles on olulised mitmed komponendid.

Tänapäeval on jõutud teadmiseni, et lisaks geneetilistele erinevustele ravimeid metaboliseerivates geenides on ravimivastuse kujunemisel oluline roll ka epigeneetilistel faktoritel. Epigeneetiline geeniregulatsioon on dünaamiline ning vastuvõtlik keskkonna tingimustele. Seega võivad keskkondlikud mõjurid, mille hulka kuuluvad ka ravimid, mõjutada ravimeid metaboliseerivate geenide ja ravimi sihtmärkgeenide ekspressiooni ja seega ka ravimivastust (Kacevska jt., 2011). Käesoleva töö eesmärgiks on uurida, kas ja kuidas mõjutavad polümorfismid ja DNA metüleerimine TPMT aktiivsust maksakoes. Uuringud on näidanud, et polümorfismid TPMT geenis avaldavad mõju ensüümiaktiivsusele, kuid geneetilised faktorid seletavad vaid osaliselt aktiivsuse varieeruvust. TPMT on oluline ravimeid metaboliseeriv ensüüm, seega on tähtis teada enne raviplaani koostamist, kuidas mõjutab indiviidi geneetiline ja epigeneetiline taust kasutatavate ravimite toimet. Soovitud ravitulemuste saamiseks tuleks eelnevalt välja selgitada TPMT aktiivsust mõjutavad faktorid, et saadud teadmiste abil oleks võimalik raviplaane individualiseerida.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Geneetiline varieeruvus ravimeid metaboliseerivates geenides

Farmakogeneetika uurib erinevaid ravimi efektiivsust mõjutavaid geneetilisi faktoreid. Manustamise järgselt interakteeruvad ravimid erinevate valkudega: transporterite, metaboliseerivate ensüümide ja retseptoritega. Need protsessid on kirjeldatavad farmakokineetika ja -dünaamikaga (Li ja Bluth, 2011). Farmakokineetika kirjeldab ravimi imendumist, jaotumist, metabolismi ja eritumist (Preskorn jt., 1993). Farmakodünaamika aitab määrata ravimi märklaudu ja kirjeldada toimetehhanisme (Goldstein jt., 2003). Farmakokineetikat mõjutavad geenid, mis kodeerivad ravimeid metaboliseerivaid ensüüme (*drug-metabolizing enzymes*, DME) ning ravimite transportereid (Goldstein jt., 2003).

Ravimite biotransformatsiooni võib jagada kaheks faasiks – esimeses faasis toimuvad funktsionaliseerumise reaktsioonid ja teises konjugatsioonireaktsioonid. I faasis toimub ravimite funktsionaalse grupi muutus kas oksüdatsiooni, reduktsiooni või hüdrolyüsi teel (Berg jt., 2002). Seda protsessi vahendavad enamasti tsüokroom P450 perekonna ensüümid, millest ravimite metabolismi seisukohalt on olulisemad CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 ja CYP3A4. Teises faasis seotakse ravim või selle I faasis tekkinud metaboliit endogeensete ainetega ning tekkivad metaboliidid on enamasti inaktiivsed (Kalra jt., 2009).

Teadlaste üheks suurimaks huviobjektiks on pikka aega olnud DME-de aktiivsust mõjutavad geneetilised põhjused, mille uurimine aitab mõista nende mõju ravimite tõhususele ja toksilisusele (Johnson, 2001).

DME-de geneetiline varieeruvus mõjutab mitmete erinevate haiguste raviks kasutatavate ravimite mõjusust (Tomalik-Schärte jt., 2008). Näiteks on leitud, et depressiooni raviks kasutatavate tritsükliliste antidepressantide metabolismis osaleva ensüümi CYP2D6 katalüütilist aktiivsust mõjutavad geneetilised polümorfismid (Baumann jt., 1986; Bertilsson jt., 2002). Ensüümiaktiivsust on võimalik ennustada vastavalt CYP2D6 genotüübile ehk funktsionaalsete CYP2D6 alleelide arvule. Kahe või ühe funktsionaalse CYP2D6 geeni koopiaga inividid on vastavalt kiired ja keskmised metaboliseerijad ning patsiendid, kellel on mõlemad CYP2D6 alleelid mittefunktsionaalsed, on aeglased metaboliseerijad (Sachse jt., 1997). On teada, et

venlafaksiiniga ravitud madala CYP2D6 aktiivsusega patsientidel on kõrgem risk kardiotoksilise ja raske arütmia tekkeks (Lessard jt., 1999).

Teise näitena võib tuua antikoagulantravimid, mille efektiivsust geneetilised faktorid mõjutavad. Trombemboolia patsiendid vajavad intensiivset ja mõnikord eluaegset antikoagulantravi. Laialdaselt kasutatakse kumariin-antikoagulante (varfariin ja atsenokumarool), mis on vitamiin K antagonistid. Neid ravimeid iseloomustab kitsas terapeutiline indeks ning märkimisväärne individuaalne erinevus ravimi tõhususes (Tomalik-Scharte jt., 2008). Varfariini manustatakse S- ja R-varfariini seguna. Varfariini eliminatsiooniteeks on maksas toimuv metabolism – S-varfariin katalüüsitakse inaktiivseteks metaboliitideks CYP2C9 ning R-varfariin CYP1A2 ja CYP3A toimel (Miners ja Birkett, 1998). Kumariin-antikoagulantide ravimite efektiivsust mõjutavad polümorfismid CYP2C9 geenis, mille regulatiivses ja kodeerivas piirkonnas on tuvastatud rohkem kui 50 ühenukleotiidset polümorfismi (*single nucleotide polymorphism*, SNP). Mõned neist põhjustavad vähenenud ensüümiaktiivsust¹. Erinevused CYP2C9 ensüümiaktiivsuses võivad põhjustada antikoagulantraviga kaasnevaid komplikatsioone, milleks on rasked veritsused või ravimi efektiivsuse puudumine (Tomalik-Scharte jt., 2008).

Kolmandaks näiteks geneetiliste faktorite mõjust ravimivastusele on vähkkasvajate raviks kasutatav 5-fluorouratsiil (*5-fluorouracil*, 5-FU), mis organismi sattudes suures osas dihüdropürimidiini dehüdrogenaasi (*dihydropyrimidine dehydrogenase*, DPD) poolt inaktiveeritakse. Kui organismis on DPD ekspressioon vähenenud või puudub, siis on oht ravimitoksilisuse kujunemiseks märgatavalt kõrgem kui normaalse DPD ekspressiooni korral. Enim kirjeldatud polümorfism DPD geenis on 14. eksonis asuv IVS14 +1 G>A, mille olemasolu korral jäetakse DPD pre-mRNA splaissingul ekson 14 vahele ning tekkiv mRNA on 165 nukleotiidi võrra lühem (Meinsma jt., 1995). Tegemist on suhteliselt harva esineva geneetilise muutusega, mis põhjustab patsientidel rasket 5-FU toksilisust (Raida jt., 2001). Seega oleks vajalik enne 5-FU ravi alustamist määrata DPD genotüüp, et vältida ravimi kõrvalmõjude teket. DME-de polümorfsus on oluline faktor, millega tuleb arvestada raviplaanide koostamisel, kuna geneetiline varieeruvus mõjutab erinevate vähkkasvajate, haavanditõve ja kardiovaskulaarhaiguste raviks kasutatavate farmakonide efektiivsust (Tomalik-Scharte jt., 2008). Teadaolevate ravimivastust mõjutavate polümorfismide rutiinne skriinimine aitaks ära hoida ravimikõrvaltoimeid ning muuta raviplaanide koostamine individuaalsemaks ning seeläbi ka efektiivsemaks.

¹ <http://www.cypalleles.ki.se/>

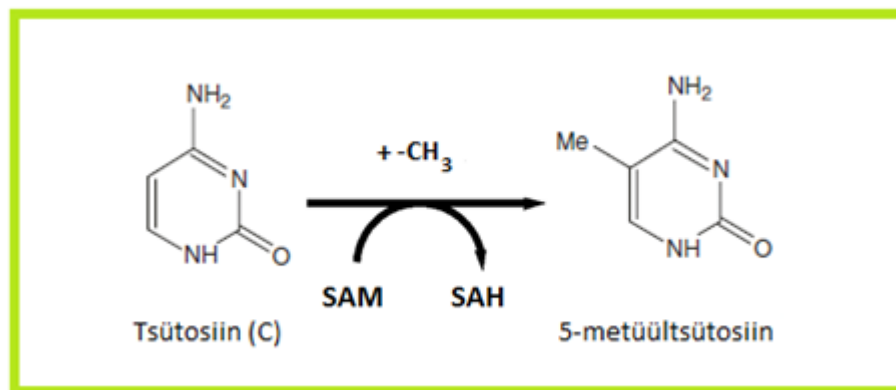
1.2 Epigeneetika

Epigeneetika on õpetus päritavatest muutustest, mis ei ole seotud muutustega DNA järjestuses (Wolffe ja Matzke, 1999). Epigeneetilised muutused põhjustavad geeniekspressiooni mustrite kordumist uues põlvkonnas. Geeniekspressioon on kontrollitud erinevate keemiliste rühmade lisamisega DNA lämmastikalustele või histoonidele või nende eemaldamisega (Henikoff ja Matzke, 1997). Epigeneetilised protsessid nagu kromatiini struktuuri modifitseerimine ja DNA metüleerimine on kaks biokeemiliselt erinevat, kuid funktsionaalselt seotud molekulaarset regulatsioonimehhanismi (Nan jt., 1998).

Samuti on leitud näiteid, et epigeneetiline DNA modifitseerimine on kaudselt seotud ka muutustega DNA järjestuses, kuna metüleeritud tsütosiinidel on suurem mutatsioonisagedus kui teistel nukleotiididel (Yang jt., 1996).

1.2.1 DNA metüleerimine

Nukleotiidide keemiline modifitseerimine mängib suurt rolli geeniekspressiooni regulatsioonis. Selgroogsete epigeneetilise regulatsiooni üks olulisemaid elemente on tsütosiinide metülatsioonimuster genoomis. Peamiselt metüleeritakse tsütosiin-guaaniin (CpG) dinukleotiidset järjestust, mis moodustab inimese genoomi kõikidest CpG järjestustest 60-90% (Razin ja Riggs, 1980; Ng ja Bird, 1999). Tsütosiini viienda süsiniku külge lisatakse metüülgrupp (-CH₃) (joonis 1), seda protsessi vahendavad DNA metüültransferaasid (Razin ja Cedar, 1977).



Joonis 1. Tsütosiini ja 5-metüültsütosiin. Tsütosiini viienda süsiniku külge lisatakse metüülgrupp (-CH₃), mille doonoriks on S-adenosüül-L-metioniin (SAM). Metülatsiooni käigus tekib S-adenosüül-L-homotsüsteiin (SAH).

Imetajatel on umbes 28 miljonit CpG saiti, mis paiknevad enamasti hõredalt üle kogu genoomi. Samas leidub lühikesi regioone, mis on CpG rikkad ja mida nimetatakse CpG saarekesteks (Ng ja Bird, 1999). Nendes on CpG dinukleotiidide tihedus oluliselt kõrgem kui mujal genoomis (Antequera ja Bird, 1993). Arvatakse, et genoomis on umbes 29 000 CpG saarekest. Ligikaudu 50-60% geenidest sisaldavad promootorpiirkonnas CpG saarekest.

Sõltuvalt kromosoomi piirkonnast, rakutüübist, arengustaadiumist ja alleeli päritolust võib CpG olla kas metüleeritud, metüleerimata või hemi-metüleeritud (ühel DNA ahelal on CpG sait metüleeritud, teisel metüleerimata) (Reinius, 2012). Erinevate CpG saitide metülatsioonitase varieerub kudedes, luues geeni- ja koespetsiifilisi metülatsioonimustreid (Razin ja Riggs, 1980). Metülatsiooni tase ei ole sama kogu geeni ulatuses.

1.2.1.1 DNA metülatsiooni mõju geeniekspressioonile

DNA metüleerimine on tõhus geeniekspressiooni regulatsiooni mehhanism. Metülatsiooni vaigistavat mõju võivad alandada kolm parameetrit, milleks on promootori tugevus, metülatsiooni tihedus ja metüleeritud CpG asukoht.

Kõrge metülatsiooni tihedus (näiteks üks metüleeritud CpG 10 bp kohta) suudab represseerida isegi tugevaid promootoreid. Madala metülatsiooni tihedusega (näiteks üks metüleeritud CpG 100 bp kohta) võib suruda maha nõrgad promootorid, kuid see ei avalda mõju tugevatele promootoritele (Boyes ja Bird 1992).

Kolmas parameeter on metüleeritud CpG asukoht geeni promootori suhtes. Mitmed uuringud on näidanud, et metülatsioonisait peab mõju avaldamiseks paiknema promootori lähedal (Keshet jt., 1985; Murray ja Grosveld, 1987). Samas on leitud, et geeniekspressiooni vaigistamine võib toimuda ka juhul, kui kõik metüleeritud alad asuvad promootorist suhteliselt kaugel (Kass jt. 1993). Eelnevalt mainitud CpG saarekete piirkonnad, kus paiknevad nii promootor kui ka transkriptsiooni alguspunkt (*transcription start site*, TSS), on tavaliselt metüleerimata ja kui see osa geenist muutub metüleerituks, siis inhibeeritakse geeniekspressioon täielikult. Samas ei ole metülatsiooni mõju geeniekspressioonile nii üheselt mõistetav. Näiteks kui TSS-i vahetus läheduses paiknev CpG on metüleeritud, siis blokeeritakse transkriptsiooni initsiatsioon. Samas metüleeritud CpG geeni sees ei avalda represseerivat mõju geeniekspressioonile, vaid võib hoopis stimuleerivalt mõjuda transkriptsiooni elongatsiooni etapile (Jones, 2012). Lisaks on leitud, et

geeni sees asuvate CpG saitide metülatsioon mõjutab splaissingut ning tsertomeeride piirkonna CpG-de metüleeritus on oluline kromosoomi stabiilsuse säilitamiseks (Moarefi ja Chedin, 2011). On kaks peamist mehhanismi, mille kaudu DNA metüleerimine geeniekspressiooni mõjutab. Üks võimalik viis geeniekspressiooni pärssimiseks on transkriptsioonifaktorite (*transcription factor*, TF) seondumise piiramine, kuna TF-id ei saa metüleeritud DNA-ga seonduda (Comb ja Goodman, 1990). Lisaks on näidatud, et DNA metülatsioon kutsub esile geeniekspressiooni vaigistamist vahendavate valkude seondumist (Tate ja Bird 1993). Üheks selliseks on metüleeritud DNA-d siduv valk 2 (*methyl CpG binding protein 2*, MeCP2), mille seondumine metüleeritud DNA-ga on seondumissignaaliks teistele valkudele ja histoone modifitseerivatele ensüümidele. Näiteks valgu SIN3A ja histooni deatsetülaasi (*histone deacetylases*, HDAC) kompleksi seondumine muudab kromatiini struktuuri suletuks ja vaigistab geeniekspressiooni (Roloff jt., 2003). On tõenäoline, et mõlemate mehhanismide abil toimub DNA metülatsiooni vahendatud geeniekspressiooni vaigistamine, kuid enamikel juhtudel on transkriptsiooni pärssimisel abiks metüleeritud DNA-d siduvad valgud (Nan jt. 1997). Samas ei muuda kõik histoone modifitseerivad ensüümid kromatiini struktuuri suletuks ega vaigista geeniekspressiooni. Histoone atsetüleerimine näiteks suurendab transkriptsiooni aktiivsust, kuna atsetüleerimise tagajärjel tekivad seondumissaidid geeni aktivatsioonis osalevatele valkudele (Filippakopoulos jt., 2012).

1.2.1.2 DNA metüültransferaasid

DNA metüleerimist viivad läbi kahte tüüpi DNA metüültransferaasid (*DNA methyltransferase*, DNMT) - *de novo* ja säilitamise (*maintenance*). Metüülühma doonoriks on S-adenosüül-L-metioniin (*S-Adenosyl methionine*, SAM) (Razin ja Cedar, 1977). Pärast metüülühma ülekannet tsütosiinile dissotsieerub demetüleeritud SAM ja seejärel vabaneb metüleeritud DNA. Kõik uuritud DNA metüültransferaasid toimivad sarnase mehhanismi alusel.

Imetajatel on leitud kolm erinevat DNMT perekonda – DNMT1, DNMT2 ja DNMT3. Kõikidel teadaolevatel DNMT-del on kõrgelt konserveerunud C-terminaalne katalüütiline domeen, kus asub katalüütiline tsenter ja koensüümi seondumissait. N-terminuses asub regulatiivne piirkond, mis on DNMT1 ning DNMT3 perekonna metüültransferaasidel erinev. N-terminus on vajalik valkude seondumiseks geeni regulatsioonis ja DNA replikatsioonis (Weber, 2007).

DNMT1 ehk säilitamise metüültransferaasi korral on *in vitro* eksperimentidega näidatud, et see metüleerib eelistatult hemimetüleeritud DNA-d (Okano jt., 1998). See on DNA, millel üks ahel on eelnevalt metüleeritud ning vastavalt sellele luuakse replikatsiooni järgselt samasugune metülatsioonimuster ka teisele ahelale.

DNMT2 on väikseim metüültransferaas, millel puudub suur osa N-terminusest. DNMT2-l on vaid katalüütiline domeen ning selle bioloogiline funktsioon pole teada. Ensüümi tase on suhteliselt kõrge platsentas, harknäärmes ja munandites. Lisaks on leitud selle üleekspressioonist mitmetes vähi rakuliinides (Weber, 2007).

Inimese DNMT3A ja DNMT3B on väga sarnased ja tõenäoliselt tekkinud geeni duplikatsiooni tagajärjel (Bestor, 2000). Need DNA *de novo* metüültransferaasid metüleerivad metüleerimata ja hemimetüleeritud DNA-d (Okano jt., 1998).

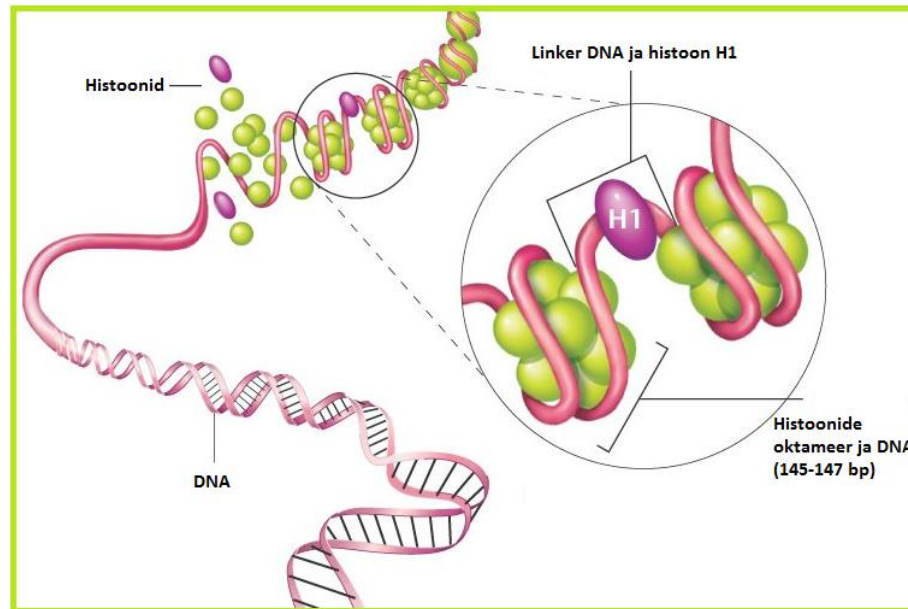
De novo DNMT-sid ekspresseeritakse peamiselt varajases arengujärgus, mil toimub metülatsiooni mustrite loomine varasemalt metüleerimata DNA-le (Okano jt., 1998). Pärast viljastumist toimub esmalt ulatuslik DNA demetülatsioon, millele järgneb kaheksa raku staadiumis teatud CpG dinukleotiidide *de novo* metüleerimine (Mayer jt., 2000). Säilitamise DNMT-d on aktiivsed kogu elu, aidates *de novo* DNMT-de poolt loodud metülatsioonimustrit säilitada (Holliday ja Pugh, 1975). On aga selge, et alati ei kehti klassikaline DNMT-de liigitamine, kuna mõlemat tüüpi ensüümid võivad osalevad nii *de novo* kui ka säilitava metülatsiooni protsessis (Szyf, 2009).

1.2.2 Kromatiini struktuur

DNA on rakutuumas kokku pakitud kromatiiniks. Kromatiin koosneb nukleosoomidest, kus DNA on keeratud ümber histoonvalkude struktuuri. Nukleosoom moodustub oktameerist, kus histooni valkude H3-H4 tetrameer külgnab mõlemalt poolt H2A-H2B dimeeriga, ning selle ümber keerdunud 145-147 aluspaari pikkusest DNA-st (Finch jt., 1977). Kahe nukleosoomi vahele jäävat DNA lõiku nimetatakse linker DNA-ks, kuhu seondub histoon H1, mis vastutab DNA pakkimise eest kõrgemat järku struktuuri (joonis 2).

See on stabiilne, kuid dünaamiline struktuur, mille kokkupakituse taset on võimalik modifikatsioonidega muuta (Mellor, 2006). Kromatiini esineb kahe vormina: inaktiivseid geene sisaldav heterokromatiin, mida seostatakse geenide epigeneetilise vaigistamisega, ning avatum

struktuur eukromatiin, mis hõlmab aktiivselt transkribeeritavaid geene. DNA metülatsioonimustrid koos histoonide modifikatsioonidega on tihedalt seotud kromatiini struktuuriga. Kõrge geeniekspressiooni tasemega kromatiini aktiivsed piirkonnad on vähem ehk hüpometüleeritud. Rohkem ehk hüpermetüleeritud DNA on tihedamini kokku pakitud passiivse kromatiini olekusse (Razin ja Cedar, 1977).



Joonis 2. DNA on rakutuumas kokku pakitud kromatiiniks, mis koosneb nukleosoomidest. Nukleosoom moodustub DNA-st, mis on keerdunud ümber histoonide oktaameeri (histooni valkude H3-H4 tetrameer ja kaks H2A-H2B dimeeri) (Finch jt., 1977). Kahe nukleosoomi vahele jääb DNA lõik, mida nimetatakse linker DNA-ks. Sinna seondub histoon H1, mis aitab DNA-d kõrgemat järku struktuuri pakkida (aluseks <http://bio3400.nicerweb.com/>).

1.2.3 Histoone modifikatsioonid

Histoone on valgud, mille kaudu toimub DNA modifitseerimine. Need koosnevad kahest struktuurselt erinevast osast – histooni „keha“ ning N- ja C-terminaalsed järjestused (Luger jt., 1997).

Histoone N-terminaalsed „sabad“ on kättesaadavad ensüümidele ning neid on võimalik keemiliselt modifitseerida. Selle tagajärjel tekivad muutused nukleosoomis, mis mõjutavad kromatiini kompleksi (Felsenfeld ja Groudine, 2003). Histoone „sabad“ võivad olla modifitseeritud erinevates aminohapete positsioonides kas atsetüleerimise (Wade jt., 1997), metüleerimise (Jenuwein, 2001), fosforüleerimise, sumoüülimise (Shiio ja Eisenman, 2003) või ubikvitüülimise (Shilatifard, 2006) kaudu. Eelnimetatud protsessid mõjutavad DNA

kättesaadavust transkriptsioonikompleksile. Histooni modifikatsioonidest on atsetüleerimisel suurim potentsiaal kromatiini struktuuri avatumaks muutmiseks (Kouzarides, 2007). Histoone "sabad" on tavaliselt positiivselt laetud, kuna nende lüsiini ja arginiini jääkidele on lisatud aminorühmad. See aitab histoonide "sabadel" seonduda DNA selgrooga. Atsetüleerimine neutraliseerib histooni positiivsed laenguid ja vähendab histoonide võimet DNA-ga seonduda. See muudab kromatiini avatumaks ja võimaldab transkriptsiooni toimumist. Histoone „sabade“ hüperatsetüleerimine korreleerub kõrge geeniekspressiooni tasemega ning madalat geeniekspressiooni taset seostatakse histoonide hüpoatsetüleerimisega (Davie ja Candido, 1978; Vidali jt., 1988).

DNA metülatiooni ja histoonide atsetüleerimise vahel on kindlaks tehtud seos – leiti, et metüülsütosiiniga seonduv valk MeCP2 meelitab ligi ka HDAC-sid. Need hüpoatsetüleerivad histoone, muudavad histoonide "sabad" positiivsemalt laetuks, DNA tihedamini kokkupakituks ja seeläbi pärsivad transkriptsioonifaktorite juurdepääsu (Nan jt., 1998).

Histoone metüültransferaasid on ensüümid, mis katalüüsivad metüülrühma ülekannet SAM-It histoonide H3 ja H4 „sabade“ lüsiini (K) või arginiini (R) jääkidele (Jia jt., 2009). Histoone metüleerimine võib transkriptsioonile mõjuda kas represseerivalt või aktiveerivalt. Suurenenud geeniekspressiooniga on seotud H3K4, H3K48 ja H3K79 metüleerimine ning madalamat geeniekspressiooni seostatakse H3K9 ja H3K27 metüleerimisega (Gilbert, 2010). Histoone „sabade“ metüleerimine nendes positsioonides põhjustab erinevate valgukomplekside seondumist, mis aitavad muuta kromatiini struktuuri.

Histoone fosforüülimine on harva esinev nähtus. Fosfaadi molekulide negatiivne laeng neutraliseerib osaliselt histooni positiivse laengu ning mõjutab histooni seondumist DNA-ga või teiste histoonidega (Dou ja Gorovsky, 2002).

Histoone valkude ubiquitüülimist on seostatud suurenenud transkriptsiooni aktiivsusega (Pham ja Sauer, 2000). SUMO valgud (*small ubiquitin-related modifier*, SUMO) sarnanevad ubiquitiinile struktuuri ja substraadiga seondumise mehhanismi poolest (Melchior, 2000). Histoone H4 sumoüülimine põhjustab transkriptsiooni repressiooni, kuna soodustab histoonide deatsetülaaside ja heterokromatiini valk 1 seondumist (Shiio ja Eisenman, 2003).

1.2.4 Epigeneetika tähtsus

Viimastel aastakümnetel on epigeneetika muutunud molekulaarbioloogia eraldi valdkonnaks, mille uurimisel on saavutatud suuri edusamme (Kacevska jt., 2011; Arrowsmith jt., 2012). DNA metüleerimine või histoonide modifitseerimine mõjutab ligikaudu 60 ravimi absorptsioonis, distributsioonis, metabolismis ja ekskretsioonis osaleva geeni ekspressiooni (Kacevska jt., 2011). Kasvab arusaam, et ravimid võivad mõjutada epigenoomi ja epigeneetilised muutused omakorda ravitulemust ning põhjustada ravimi kõrvaltoimeid.

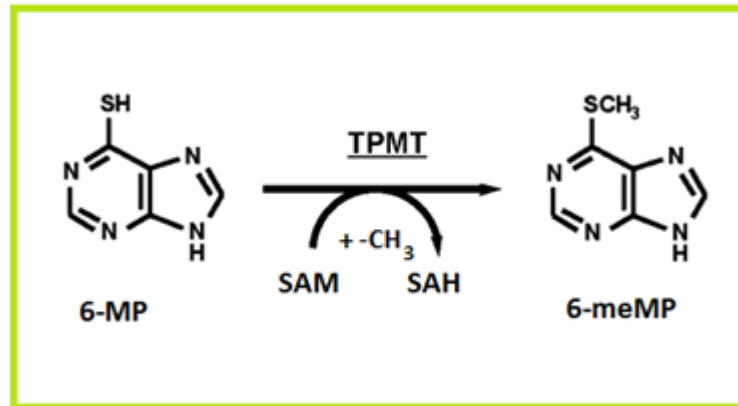
Ühe näitena võib tuua CYP1A2 ensüümi, mis osaleb mitmete laialdaselt kasutusel olevate ravimite metabolismis (Zhou jt., 2010). On teada, et ühenukleotiidsed polümorfismid CYP1A2 geenis suudavad seletada vaid osaliselt individuaalseid erinevusi CYP1A2 ekspressioonis (Jiang jt., 2006). Seetõttu on pakutud, et lisaks geneetilistele faktoritele võiksid geeniekspressiooni mõjutada ka epigeneetilised faktorid. On tõestatud, et teises eksonis asuva 17 CpG dinukleotiidist koosneva CpG saarekese metülatsioonitase on seotud erineva CYP1A2 mRNA tasemega (Ghotbi jt., 2009). Samuti on näidatud, et geeniekspressiooni võib mõjutada isegi ühe transkriptsiooni alguspunktist 2579 aluspaari ülesvoolu asuva CpG dinukleotiidi metülatsioon. Epigeneetilised erinevused võivad patsientidel põhjustada erinevusi CYP1A2 abil metaboliseeruvate ravimite taluvuses ning põhjustada ravimi kõrvaltoimeid.

SLC19A1 geenilt kodeeritakse redutseeritud folaadi kandjat (*reduced folate carrier*, RCF). Tegemist on ensüümiga, mis vastutab folaadi ja antimetaboliidi metotreksaadi (*methotrexate*, MTX) omastamise eest. MTX on kasvajate raviks kasutatav farmakon, mis pärsib foolhappe ainevahetust, takistades sellega foolhappe redutseerimist ja seega koerakkude paljunemist. RCF-i varieeruvat taset on seostatud SLC19A1 geeni promootori metüleerimisega. On oletatud, et SLC19A1 promootori kõrgem metülatsioonitase soodustab resistentsuse kujunemist kasvajarakkudes (Ferrerri jt., 2004).

Epigeneetika valdkond on väga oluline ravimiarenduse seisukohast. Epigeneetilised geeniregulatsiooni kontrollmehhanismid on vähi ja teiste haiguste ravimite arendamisel atraktiivseteks sihtmärkideks. Seetõttu on vajalik epigeneetiliste mehhanismide mõju erinevatele kasutatavatele ravimitele ning ka haigustele põhjalikumalt uurida.

1.3 Tiopuriinmetüültransferaas

Tiopuriinmetüültransferaas (*thiopurine methyltransferase*, TPMT) on tsütoplasma ensüüm, mis katalüüsib metüülrühma ülekannet SAM-ilt aromaatsetele ja heterotsükliilistele väävliühenditele, sealhulgas tiopuriinravimitele nagu 6-merkaptopuriin (6-MP), asatiopriin (AZA) ja 6-tioguaaniin (6-TG) (joonis 3) (Remy, 1967; Woodson ja Weinshilbourn, 1983; Weinshilbourn, 1989a).



Joonis 3. TPMT katalüüsitud metüülrühma ülekanne S-adenosüül-L-metioniinilt (SAM) 6-merkaptopuriinile (6-MP). Metüülatiooni käigus tekib 6-metüleeritud merkaptopuriin (6-MeMP) ja S-adenosüül-L-homotsüsteiin (SAH). (aluseks Weinshilbourn, 2006).

1.3.1 Tiopuriinmetüültransferaasi geen ja valk

TPMT geen asub inimesel 6. kromosoomi lühikesel õlal (6.p22.3), on 27 000 aluspaari pikk ning koosneb 10 eksonist ja 9 intronist. Geeni 8 eksonilt kodeeritakse 28 kDa suurust valku, mis koosneb 245 aminohappest (Fessing jt., 1998). TPMT on üks tähtsamatest tiopuriinide metabolismis osalevatest ensüümidest, kuid ulatuslikest uuringutest hoolimata on TPMT ensüümi füsioloogiline tähtsus organismis ebaselge (Fotoohi jt., 2010).

Valgu struktuur määrati 2007. aastal (Wu jt., 2007). Tegemist on väga polümorfse ensüümiga, mis tähendab, et ensüümiaktiivsus varieerub indiviiditi. Sellist individuaalset erinevust põhjustavad peamiselt ühenukleotiidsed polümorfismid (*single-nucleotide polymorphism*, SNP), mis päranduvad edasi autosoom-kodominantselt.

1.3.2 TPMT polümorfsus

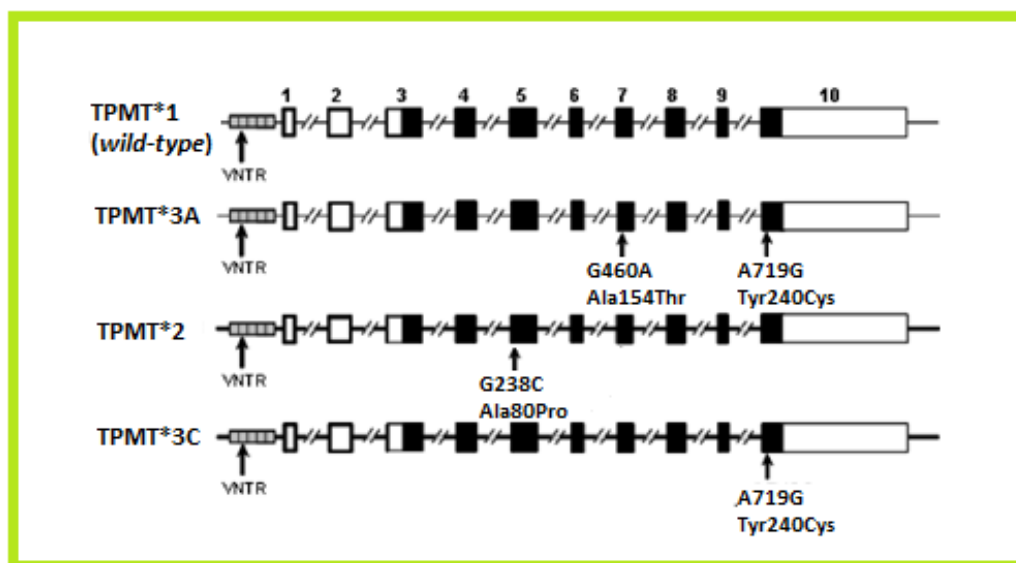
Tänapäevaks on leitud 36 erinevat mutantset alleeli, mille mõju TPMT valgu ekspressioonitasemele ja ensüümiaktiivsusele on kirjeldatud lisa 1 tabelis 1.

Kõige sagedasemad mutatsioonid on TPMT*2, TPMT*3A ja TPMT*3C, mis vastutavad ~85-90% madala või keskmise tasemega ensüümi aktiivsuse eest (McLeod jt., 2000). TPMT*1 on metsiktüüpi (*wild-type*) alleel, TPMT*1/TPMT*1 homosügootidel on reeglina normaalne ensüümiaktiivsus (joonis 4). Ülejäänud mutantseid allelele on leitud üksikutel indiviididel (viited tabelis 1).

Lisaks on TPMT geeni promootori piirkonnas TSS-st 43 aluspaari kauguselt leitud varieeruva arvuga tandeemseid kordusjärjestusi (*variable number of tandem repeats*, VNTR), mille korral korduselemendid esinevad kolmes kuni üheksas korduses (Spire-Vayron de la Moureyre jt., 1999). Kõige levinum korduselementide arv on neli või viis (Spire-Vayron de la Moureyre jt., 1999, Yan jt. 2000). VNTR-de mõju TPMT aktiivsusele on palju uuritud. Ühes uuringus leiti, et kahe alleeli kordusjärjestuste koguarv on pöördvõrdelises seoses punaste vererakkude TPMT aktiivsusega (Yan jt. 2000). Lisaks on kõrget TPMT aktiivsust seostatud VNTR*4/VNTR*5 ja VNTR*5/VNTR*5 genotüübiga ja madalat aktiivsust genotüüpidega, mis sisaldavad vähemalt ühte rohkem kui viie kordusjärjestusega alleeli (Alves jt., 2001).

2008. aastal tuvastati TPMT geeni promootorpiirkonnas trinukleotiidne korduselement (GCC), millel leiti seos kõrge ensüümiaktiivsusega. GCC järjestus leiti kahel põletikulise soolehaigusega patsiendil, kelle TPMT aktiivsus oli märgatavalt kõrgem. Esimesel haigel leiti üks TPMT alleel viie ja teisel seitsme GCC kordusjärjestusega. Normaalse ensüümiaktiivsusega indiviidil leiti GCC järjestus kuues korduses (Roberts jt., 2008).

Geneetiliste muutuste olemasolu ei avaldu tervete indiviidide fenotüübis, kuid nende esinemine muutub oluliseks tiopuriinravimite manustamisel (Lennard jt., 1993).



Joonis 4. TPMT alleelid. TPMT * 1 on *wild-type* alleel. TPMT*3A, TPMT*2 ja TPMT*3C – need kolm alleeli vastutavad rohkem kui 80% juhtudest TPMT puudulikkuse eest valge rassi hulgas. Mustad ristkülikud kujutavad avatud lugemisraami (*open reading frames*, ORF) ja valged 5'-ja 3'-transleerimata piirkondi (5'-UTR ja 3'-UTR). Geeni 5'-UTR-is asuvad varieeruva arvuga tandeemsed kordusjärjestused (*variable number tandem repeats*, VNTR) (aluseks Weinshilboum 2006).

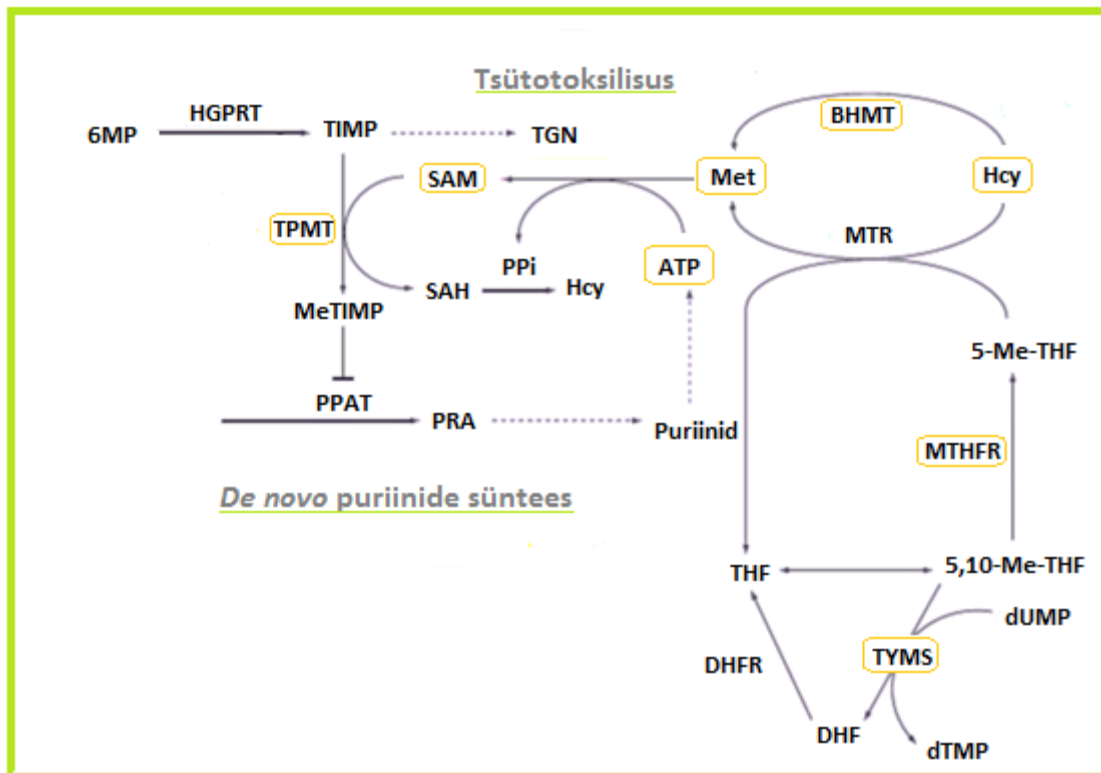
1.3.3 TPMT ensüümiaktiivsus

TPMT ensümaatilist aktiivsust määratakse peamiselt punastest vererakkudest (*red blood cells*, RBC) kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (*High-performance liquid chromatography*, HPLC) meetodiga (Loit jt., 2011). TPMT aktiivsus erütrotsüütides korreleerub hästi TPMT aktiivsusega teistes kudedes – valgetes vererakkudes, maksas ja neerudes (Szumlanski jt., 1992).

Erinevate uuringute põhjal on näidatud, et populatsioonisiseselt jaotub TPMT aktiivsus trimodaalselt. 0,3% indiviididel on keskmiselt väga madal ensüümiaktiivsus, ligikaudu 10% on ensüümiaktiivsus osaliselt vähenenud ja 89% on TPMT aktiivsus normaalne (Krynetski jt., 1996). Siimaani on näidatud, et TPMT aktiivsuse taset inimorganismis mõjutavad suurel määral geenis paiknevad mutatsioonid ja polümorfismid (tabel 1) (Weinshilboum ja Sladek, 1980).

Hoolimata TPMT genotüübi ja fenotüübi määramisest enne ravi alustamist, tekivad tiopuriinravimite manustamisel toksilised kõrvaltoimed, seda eriti heterosügootse TPMT genotüübiga indiviidide korral (Karas-Kuzelicki ja Mlinaric-Rascan, 2009). See annab alust arvata, et TPMT aktiivsusele ja seega organismi ravimitaluvusele avaldavad mõju mitmed, sh. veel tundmatud faktorid. *In vitro* katsetes on näidatud, et lisaks TPMT geenis esinevatele muutustele on identifitseeritud veel vähemalt üks TPMT aktiivsust reguleeriv faktor SAM ja selle

biosünteesis osalevad komponendid, milleks on folaat, metioniin, homotsüsteiin (*Homocysteine*, Hcy), ATP, betaiin-homotsüsteiini metüültransferaas (*betaine-homocysteine methyltransferase*, BHMT), 5,10-metüleen-tetrahüdrofolaat (*methylenetetrahydrofolate reductase*, MTHFR) ja tümidülaadi süntaas (*thymidylate synthase*, TYMS) (joonis 5) (Milek jt., 2009; Karas-Kuzelicki jt., 2010). Leiti, et SAM ei ole otseselt antiapoptootilise toimega, vaid pigem muudab 6-MP metabolismi dünaamikat ja seeläbi vähendab tsütotoksiliste metaboliitide hulka. SAM-i seondumine TPMT aktiivsaiti stabiliseerib ensüümi ja aitab säilitada ensüümiaktiivsust (Scheuermann jt. 2004). Mida kõrgem on folaaditsükli MTHFR-i tase ja madalam TYMS-i aktiivsus, seda rohkem tekib metüülrühma doonorit metioniini ning seega sünteesitakse rohkem SAM-i ja vastupidi (Milek jt., 2009).



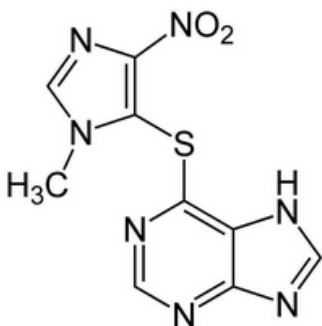
Joonis 5. TPMT aktiivsust mõjutavad faktorid. 6-merkaptopuriini (6-MP) inaktivatsioon sõltub tiopuriinmetüültransferaasi (TPMT) aktiivsusest, mis omakorda on mõjutatud S-adenosüül-L-metioniini (SAM) tasemest. SAM-i biosüntees on seotud metioniini (Met) ja ATPga ning metioniini tase omakorda homotsüsteiini (Hcy) ja folaaditsükliga. Folaaditsükli tuleb tümidülaadi süntaasil (TYMS) konkureerida 5,10-metüleen-tetrahüdrofolaadi reduktaasiga (MTHFR) 5,10-metüleen-tetrahüdrofolaadilt (5,10-meTHF) metüülrühma saamiseks. Mida kõrgem on MTHFR-i tase ja madalam TYMS-i aktiivsus, seda rohkem tekib metüülrühma doonorit metioniini ning seega sünteesitakse rohkem SAM-i ja vastupidi. Lisaks võib SAM-i taset mõjutada alternatiivse metioniini sünteesiraja oluline ensüüm betaiin-homotsüsteiini metüültransferaas (BHMT) (aluseks Karas-Kuzelicki ja Mlinaric-Rascan 2009).

Samas leiti ühes uuringus, et meestel korreleerus kõrge MTHFR-i aktiivsusega seotud genotüüp kõrge TPMT aktiivsusega ja naistel leiti madala MTHFR-i aktiivsusega seotud genotüübil seos kõrge TPMT aktiivsusega (Karas-Kuzelicki jt., 2010).

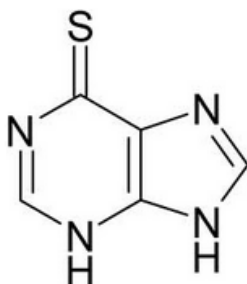
Lisaks võib TPMT aktiivsuse soospetsiifilisi erinevusi seletada metioniini ja SAM-i sünteesiks vajaliku substraadi Hcy kättesaadavusega, kuna meestel on Hcy tase ligikaudu 20% kõrgem kui naistel (Jacques jt., 2001). Oluline roll võib olla ka BHMT metabolismirajal. Meestel on tuvastatud selle alternatiivse metioniini sünteesiraja keskse ensüümi BHMT kõrgem aktiivsus (Schwahn jt., 2003). Spekuleeritud on ka testosterooni positiivse mõju üle TPMT aktiivsusele. Itaalias viidi läbi uuring, kus vaadati meeste ja naiste TPMT aktiivsust erinevates vanusegruppides. Väikelastel tuvastati sugude vahel statistiliselt oluline ensüümiaktiivsuse erinevus – poistel oli aktiivsus märgatavalt kõrgem kui tüdrukutel. Lisaks leiti, et esimestel elukuudel oli meessoost indiviididel TPMT aktiivsuse tase kõrgem, millele järgnes ensüümiaktiivsuse langus kuni puberteedini. Murdeas toimus TPMT aktiivsuses märgatav tõus, pärast mida ensüümiaktiivsus taas langes (Serpe jt., 2009). Selline aktiivsuse kõikumine võiks olla seotud testosterooni tasemega (Bolton jt., 1989). Testosterooni mõju TPMT aktiivsusele on tuvastatud ka rottidel (Woodson jt., 1981). Hoolimata mitmetest uuringutest, mis on püüdnud selgitada soo mõju TPMT aktiivsusele, pole suudetud seda üheselt tuvastada, vaid on saadud vastuolulisi tulemusi (Woodson jt., 1982; Chocair jt., 1993; Alves jt., 2001; Brouwer jt., 2005; Serpe jt., 2009).

1.4 Puriini analoogid ja nende metabolism

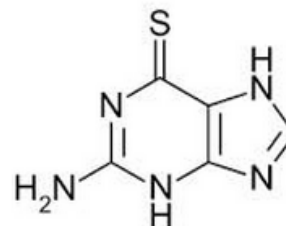
6-MP, AZA ja 6-TG on puriini analoogid – antimetaboliitide klassi kuuluvad tsütotoksilised ravimid, mille sünteesisid 1951. aastal Elion ja Hitchings (joonis 6) (Elion jt., 1951). 1958. aastal avastasid Schwartz jt. 6-MP-l immuunosupressiivse mõju ning peagi pärast seda sünteesiti Hitchings-Elioni laboris mitmeid 6-MP derivaate, sealhulgas tänapäeval laialdaselt kasutatava eelravimi AZA, mis organismi sattumise järgselt muudetakse 6-MP-ks (Schwartz jt., 1958; Fotoohi jt., 2010).



Asatiopriin (AZA)



6-merkaptopuriin (6-MP)



6-tioguaaniin (6-TG)

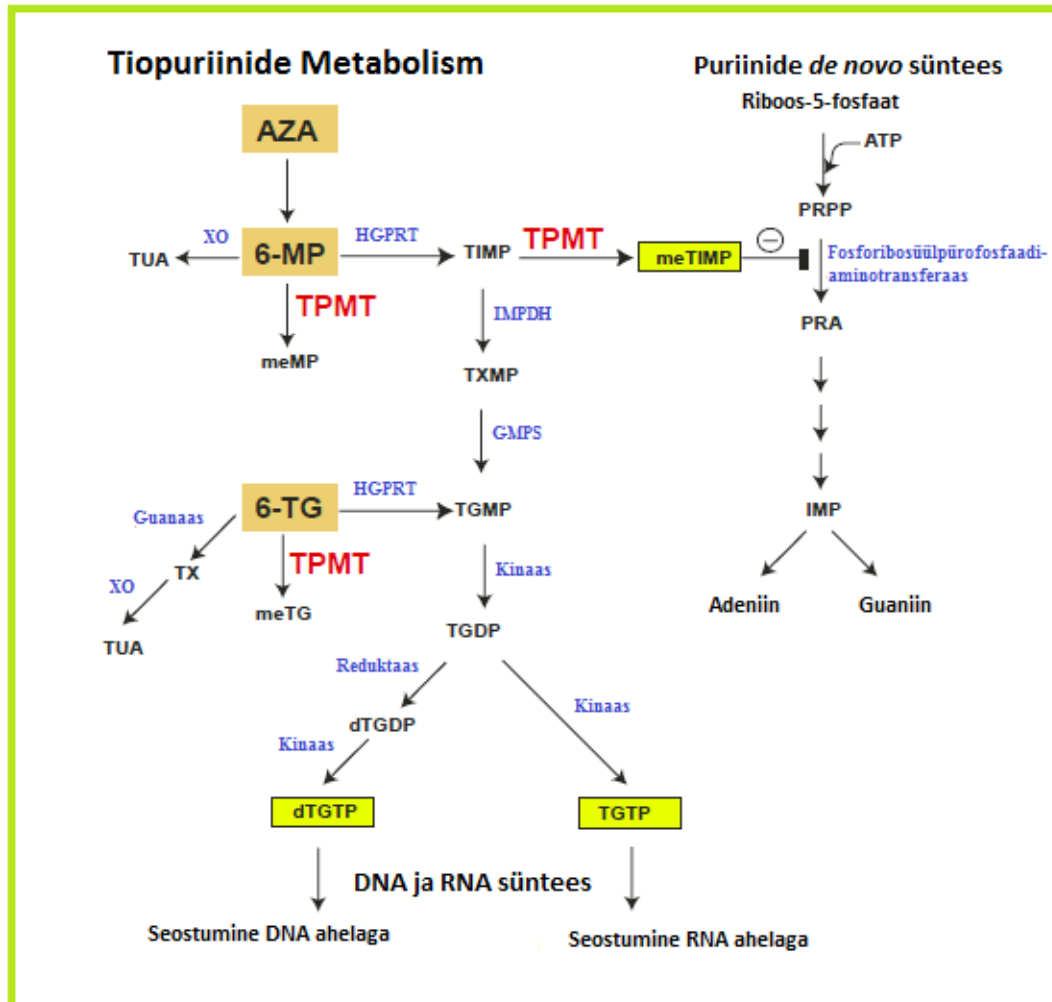
Joonis 6. Asatiopriini, 6-merkaptopuriini ja 6-tioguaaniini struktuurvalemid. 6-MP on nukleiinhapete sünteesiks vajaliku adeniini ja hüpoksaantiini analoog. Asatiopriin on 6-MP imidasooli derivaat. Tioguaaniin on guaniini analoog, mis käitub puriini antimetaboliidina.

Ksantiinoksüdaasi (*Xanthine oxidase*, XO), TPMT ja aldehüüdoksüdaasi (*Aldehyde oxidase*, AO) kaudu metaboliseerudes moodustuvad inaktiivsed metaboliidid (Guerciolini jt., 1991; Fotoohi jt., 2010).

AZA muudetakse mitte-ensümaatilisel 6-MP-ks, millest moodustuvad hüpoksaantiinguaaniin-fosforibosüültransferaasi (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*, HGPRT) kaudu metaboliseerudes tioguaaniinnukleotiidid (*thioguanine nucleotides*, TGN), mis DNA või RNA-ga seondudes põhjustavad rakutsükli peatumist S-faasis ja programmeeritud rakusurma (Krynetski jt., 1996; Swann jt., 1996).

6-MP metaboliseeritakse kolme konkureeriva metabolismiraja kaudu. Ensüümid XO ja TPMT inaktiveerivad ravimit. Maksas muudetakse 6-MP XO toimel tiouuraadiks ja TPMT abil moodustuvad inaktiivsed metüülmerkaptopuriini (6-MeMP) metaboliidid, mis väljutatakse uriiniga (Parks ja Granger, 1986). 6-MP aktivatsiooni esimeseks etapiks on 6-tioinosiin-5'-monofosfaadi (*6-thioinosine 5'-monophosphate*, TIMP) tekkimine, protsessi vahendab HGPRT (joonis 7). Seejärel muudetakse TIMP 6-tioguaanosiin-5'-monofosfaadiks (*6-thioguanosine 5'-monophosphate*, TGMP) kaheetapilise protsessi käigus, milles osalevad inosiin monofosfaadi dehüdrogenaas (*inosine-5'-monophosphate dehydrogenase*, IMPDH) ja guanosiin monofosfaadi süntetaas (*guanine monphosphate synthetase*, GMPS) (Elion, 1989). Lisaks on TIMP substraadiks ka TPMT-le, mille tagajärjel tekib metüleeritud 6-tioinosiin-5'-monofosfaat (*methylated 6-thioinosine 5'-monophosphate*, meTIMP). MeTIMP inhibeerib fosforibosüülpürofosfaadi (*phosphoribosyl pyrophosphate*, PRPP) aminotransferaasi (*phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase*, PPAT), mis omakorda vähendab oluliselt de

novo puriinide sünteesi (Allan ja Bennett, 1971; Elion, 1989). Inhibitsiooni tagajärjel väheneb endogeensete nukleotiidide hulk, pärssides DNA ja RNA sünteesi ja põhjustades rakkude kasvu peatumist ja tsütotoksilisust (Tay jt., 1969).



Joonis 7. Tiopuriinravimite metabolism. Asatiopriin (AZA) muudetakse mitte ensümaatilisel 6-merkaptopuriiniks (6-MP). 6-MP lagundamisel osaleb kolm ensüümi. Ksantiinoksüdaasi (XO) toimel muudetakse 6-MP inaktiivseks tiouuraadiks (*thiouric acid*, TUA). Tiopuriinmetüültransferaasi (TPMT) abil moodustuvad inaktiivsed metüülmerkaptopuriini (6-MeMP) metaboliidid. 6-MP aktivatsiooni esimeses etapis tekib hüpoksaantiinguaanifosforibosüültransferaasi (HGPRT) toimel 6-tioinosiin-5'-monofosfaat (TIMP). TIMP muudetakse inosiin monofosfaadi dehüdrogenaasi (IMPDH) ja guanosiin monofosfaadi süntetaasi (GMPS) vahendusel aktiivseks metaboliidiks 6-tioguanosiin-5'-monofosfaadiks (6-TGMP). 6-TGMP-st võivad kinaaside ja reduktaaside toimel tekkida teised aktiivsed metaboliidid: 6-tioguanosiin-5'-difosfaat (TGDP) ja 6-tioguanosiin-5'-trifosfaat (TGTP). TIMP on substraadiks ka TPMT-le, mille tagajärjel tekib metüleeritud 6-tioinosiin-5'-monofosfaat (meTIMP). MeTIMP inhibeerib fosforibosüülpürofosfaadi-aminotransferaasi vähendades oluliselt *de novo* puriinide sünteesi. 6-tioguaaniini (6-TG) metabolismirajas muudetakse ravim HGPRT toimel otse TGMP-ks. TGMP võib ensümaatilise modifitseerimise tagajärjel muutuda desoksü-6-tioguanosiin-5'-trifosfaadiks (dTGTP) (aluseks Lindqvist, 2005).

Lisaks kuhjub rakkudes PRPP, mis on kofaktoriks 6-MP konversioonil TIMP-ks. Suurem hulk PRPP-d põhjustab TIMP taseme tõusu (Bökkerink jt. 1993). 6-MP aktiivseid metaboliite TGMP,

6-tioguanosiin-5'-difosfaat (*thioguanine diphosphate*, TGDP) ja 6-tioguanosiin-5'-trifosfaat (*thioguanine triphosphate*, TGTP) kutsutakse ühise nimega 6-tioguaaninukleotiidid (6-TGN). Konversioon nende vahel toimub kinaaside ja reduktaaside toimetel.

6-TG metabolismirada on võrreldes 6-MP-ga lihtsam. Ravim muudetakse HGPRT toimetel otse TGTP-ks, mis seondub RNA-ga või pärast ensümaatilist modifitseerimist desoksü-6-tioguanosiin-5'-trifosfaadiks (*deoxythioguanine triphosphate*, dTGTP) DNA-ga (joonis 7). Seandumine DNA-ga põhjustab rakutsükli aresti, valepaardumisreparatsiooni mehhanismi käivitumist ning lõpuks apoptoosi (Swann, jt. 1996).

1.4.1 TPMT vahendatud metülatiooni kliiniline tähtsus

Mutatsioonid/polümorfismid TPMT geenis põhjustavad individuaalseid erinevusi tiopuriinravi taluvuses ja efektiivsuses (Weinshilboum ja Sladek, 1980), kuna ensüümiaktiivsuse languse tagajärjel kuhjuvad organismi ravimi aktiivsed metaboliidid, TGN-id, mis tekitavad patsiendil tõsiseid, eluohtlikke ravimi kõrvalnähte nagu leukopeenia, müelosupressioon või hematotoksilisus (Lennard jt., 1987). TGN-id inkorporeeruvad DNA ahelasse ja tekitavad valepaardumisi, mille tagajärjel rakutsükkel peatatakse ja rakk suunatakse apoptoosi (Swann jt., 1996). Lisaks osalevad TGN-id T-rakkude aktivatsiooniks vajalike ensüümide TRAIL, TNFRS7 ja $\alpha 4$ -integrini geenide ekspressiooni mahasurumisel, mis vähendab põletikulist immuunvastust (Thomas jt., 2005).

Tsütotoksiliste ravimite keskmise terapeutilise ja minimaalse toksilise annuse suhe ehk terapeutiline indeks on madal (Fotoohi jt., 2010). Kui kõiki patsiente ravida standarddoosidega, siis pooltel heterosügootse TPMT genotüübiga ning kõigil mutantse homosügootse TPMT genotüübiga patsientidel tekib maksatoksilisus, mis võib viimastele eluohtlik olla (Evans ja Relling, 2004). Tiopuriinide toksilisus on seletatav metabolismi käigus tekkivate TGN-ide kuhjumisega punastesse vererakkudesse ning maksa (Fotoohi jt., 2010). Lisaks suurendab ensüümi puudulikkus raviga seotud müeloidse leukeemia tekkeriski (Evans ja Relling, 2004) ning radiatsiooni tagajärjel tekkivate ajukasvajate esinemise tõenäosust (Relling jt., 1999). Samas kõrge TPMT ensüümiaktiivsusega patsientidel on suurem haiguse kordumise oht, kuna ravimi efektiivsus on väiksem tänu kiiremale lagundamismehhanismile (Stanulla jt., 2005).

1.5 Äge lümfoidne leukeemia

Lapseea äge lümfoidne leukeemia (ALL) on kõige levinum vähkkasvaja, esindades ligikaudu kolmandikku lastel esinevatest kasvajatest (Gaynon, 2005). Viimase nelja aastakümnega on üldine paranemismäär tõusnud 10%-lt 1960. aastatel rohkem kui 80%-le tänapäeval, seda tänu diagnostika arengule ning raviplaanide täiustumisele. Hoolimata edusammudele haigusega võitlemisel, on ALL endiselt peamiseks haigusega seotud surmade põhjustajaks 1 kuni 15 aastaste laste seas USA-s (Cheok ja Evans, 2006).

ALL on kiiresti progresseeruv pahaloomuline kasvaja haigus. Muutused lõpuni arenemata lümfoidsete vereloome rakkude DNA-s põhjustavad rakkude kontrollimatu jagunemise ning võivad põhjustada arengu peatumise mingis kindlas faasis, mille tagajärjeks on suutmatus täita küpsete rakkude funktsiooni (Armstrong ja Look, 2005; Pui jt., 2008). ALL jaotatakse erinevateks vormideks vastavalt rakutüübile, millest kasvaja on lähtunud. Eristatakse B-lümfotsütaarset ja T-lümfotsütaarset ALL-i (Margolin jt., 2006). ALL alatüübid alluvad ravile erinevalt, B-tüve puhul on haiguse prognoos parem. Seega tuleb vastavalt ägeda leukeemia vormile valida ka raviks sobiv skeem (Pui jt., 2008).

Lisaks on võimalik ALL-i tüüpe eristada leukeemiliste lümfoblastide morfoloogiat uurides, kuid tänapäeval kasutatakse pigem rakutüübipõhist klassifikatsiooni. Raku suuruse ja ehituse alusel eristatakse kolme ALL alatüüpi – L1, L2 ja L3. L1 ALL-i iseloomustavad tavaliselt väikesed lümfoblasti rakud ja vähene tsütoplasma hulk. L2 korral on lümfoblasti rakud suuremad kui L1 alatüübi puhul. Rakkude suurus varieerub märkimisväärselt ning tsütoplasma hulk rakkudes on suurem. L3 alatüüpi iseloomustavad suured lümfoblasti rakud. Rakkudes võib sageli märgata tsütoplasma vakuoliseerumist (Bennett jt., 1976).

Tänapäeval kasutatakse ALL ravis mitmeid raviskeeme, mis erinevad kasutatavate ravimite, nende dooside ning kasutamisaja poolest. Igale ALL tüübile on välja töötatud vastav raviplaan ning ravimiteraapiat valides võetakse arvesse ka individuaalseid geneetilisi erinevusi ravimeid metaboliseerivates geenides, haiguse iseloomu, patsiendi vanust ning üldist tervislikku seisundit (Aricò jt., 2000; Evans ja McLeod, 2003; Adam de Beaumais ja Jacqz-Aigrain, 2012). Selline lähenemine on muutnud ravi edukamaks ning aidanud vähendada ravimite toksilisusest põhjustatud kõrvalmõjude esinemist.

Leukeemia on süsteemne haigus, mille ravi baseerub peamiselt kemoteraapial. Keemiaravi võib jagada erinevatesse etappidesse – induktsioon, konsolidatsioon või intensiivistamine ja säilitav ravifaas. Raviskeemi esimene osa on induktsioonravi, mille eesmärgiks on remissiooni saavutamine. Ravi loetakse edukaks, kui luuüdist ei ole võimalik enam kasvajakke tuvastada (Pui ja Evans, 2006). Kuna induktsioonravi ei suuda kõiki vähirakke hävitada, siis ei tohi pärast remissiooni saavutamist ravi lõpetada. Normaalse hematopoeesi taastumisel alustatakse järgmise raviskeemi osaga, milleks on konsolidatsioon või intensiivistamine. Konsolidatsiooni etapis korraldatakse ravikuuri eesmärgiga suurendada paranemise taset ja pikendada remissiooni kestust. Intensiivistamise faasis manustatakse patsiendile samu kemoteraapia ravimeid, kuid kõrgemates doosides. Mõlema etapi eesmärk on remissiooni kestuse pikendamine, viimaste kasvajakude elimineerimine ning haiguse ägenemise vältimine (Pui jt., 2004). Konsolidatsioonile või intensiivistamisele järgneb säilitav ravifaas, mille eesmärk on eelnevate ravifaaside jooksul alles jäänud kasvajakude hävitamine. Säilitusravi etapp on eelnevatest vähemintensiivne, kuid kestuselt kõige pikem. ALL ravi võib alates diagnoosimisest kesta 2,5 kuni 3 aastat (Aricò jt., 2000).

Erinevates etappides kasutatakse erinevaid ravimite kombinatsioone, et tagada parim ravitulemus. Nii konsolidatsiooni kui säilitusravi etapis kasutatakse ühe ravimina 6-MP-d, mille inaktivatsioonil osaleb ensüüm TPMT. Kliinilises praktikas on ravimiteraapia edendamisel enim tulemusi andnud TPMT polümorfismide ja aktiivsuse uuringud. Tänapäevaks on paljudes kliinikutes 6-MP ravimidooside määramisel aluseks võetud TPMT aktiivsus. Enne raviplaani koostamist teostatakse genotüüpiseerimine või määratakse TPMT fenotüüp, mis võimaldab kõrvaltoimetest ohustatud madalama TPMT aktiivsusega patsientidel kasutada standarddoosist väiksemaid annuseid (Evans jt., 2001; Relling jt., 2011).

1.6 Põletikulised soolehaigused

Põletikuliste soolehaiguste (IBD) tekkepõhjusi on proovitud tuvastada juba pikki aastaid. Kliiniliste ja teaduslike uuringute tulemuste põhjal on jõutud järelduseni, et IBD kujunemisel on olulised geneetiliste, keskkondlike ja immunoloogiliste faktorite koosmõjud (Järnerot, 1996; Fiocchi, 1998; Papadakis ja Targan, 1999; Petronis ja Petroniene, 2000). Arvatakse, et päriliku eelsoodumusega inimestel tekitab bakter, viirus, toitumine või muu väliskeskkonna faktor sooles

kroonilise põletikureaktsiooni (Papadakis ja Targan, 1999). Haavandiline koliit ja Crohni tõbi on kroonilise põletikulise soolehaiguse vormid, mille epidemioloogias ja sümptomites esineb palju sarnasusi, kuid tegemist on kahe eraldiseisva haigusega (Petronis ja Petroniene, 2000).

1.6.1 Haavandiline koliit

Haavandiline koliit on idiopaatiline põletikuline soolehaigus, mida iseloomustab jämesoole limaskesta krooniline põletik. Haigus algab kõige sagedamini pärasoolest. Haavandiline koliit võib haarata ainult jämesoole vasaku poole või kogu soole limaskesta. Haiguse kulule on iseloomulikud põletikureaktsiooni ägenemised ja vaibumised (Ford jt., 2013). Pikaajalise põletiku tagajärjel võivad tekkida haavandid, mis põhjustavad verejooksu ning võib tekkida kehvveresus (Baumgart ja Sandborn, 2007).

Haiguse kõrgeim esinemissagedus on arenenud maailmas, kuid levimus suureneb ka arengumaades. Haavandilise koliidi ravi üheks eesmärgiks on aidata kaasa haiguse taandumisele (Neurath ja Travis, 2012). Põletikuvastase ja immuunsupressiivsete ravimite manustamine aitab vältida haiguse ägenemist ja ennetada pikaajalisi tagajärgi (Ford jt., 2013). Haavandilise koliidi epidemioloogia varieerub kogu maailmas. Raviplaanid liigitatakse ja kohandatakse vastavalt haiguse raskusastmele. Enim kasutatavad ravimid on sulfasalasiin või mesalamiin ja kortikosteroidid, mis pärsvad tsütokiinide ja teiste põletikumediaatorite produktsiooni. Lisaks kasutakse põletikuga võitlemiseks ka immuunsupressiivseid ravimeid nagu asatriopiin, tsüklosporiin, metotreksaat ja metronidasool, mis aitavad säilitada glükokortikosteroidide poolt indutseeritud remissiooni (Khan jt., 2011). Glükokortikosteroidide ravi saavatel patsientidel tuleks pidevat jälgida vererõhu, veresuhkru ja luu mineraalse tiheduse taset. Tiopuriinid võivad põhjustada luuüdi supressiooni, seega enne tiopuriinidega ravi alustamist tuleks patsiendil määrata ka TPMT aktiivsus. Madala TPMT aktiivsusega indiviididel on suurenenud risk müelosupressiooni kujunemiseks ning vajadusel tuleks antud ravimeid kasutada äärmiselt ettevaatlikult või vältida (Ford jt., 2013).

1.6.2 Crohni tõbi

Crohni tõbi on teine kroonilise põletikulise soolehaiguse vorm. Erinevalt haavandilisest koliidist võib Crohni tõbi põhjustada põletikku ja sügavaid haavandeid kogu soolestiku ulatuses – suust kuni pärakuni, kuid kõige sagedamini tekib haigus peensoole lõpposas (Silverberg jt., 2005). Põletikukolded, kus paksenenud limaskestas esinevad ka haavandid, paiknevad laiguti. Haavandite kohal võivad tekkida ebanormaalsed ühendused soolte osade, teiste elundite ja naha vahel. Haigusele on iseloomulikud verejooksud ja soole paksenemise tagajärjel võib tekkida sooleummistus (Freeman, 2003).

Crohni tõve raviplaani koostamisel peab arvesse võtma haiguse kõiki aspekte – haiguse intensiivsust, piirkonda, kus haiguskolded esinevad, haiguse kulgu ja iseloomu (Travis jt., 2006). Haigusega võitlemiseks kasutatakse 5-aminosalitsüülhapet sisaldavaid ravimeid nagu näiteks sulfasalasiin, mesalamiin ja balsalamiin. Kortikosteroidide manustamine on vajalik, kui esialgne ravi ei anna soovitud tulemusi (Knutson jt., 2003; Zavoilo, 2004). Patsientidel, kellel esineb haiguse ägenemisi rohkem kui kord aasta jooksul, kasutatakse põletiku vähendamiseks ka immuunomodulaatoreid nagu asatriopiini ja 6-merkaptopuriini (Present jt., 1980).

2 EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö praktilise osa eesmärgiks oli määrata TPMT aktiivsus maksas. Lisaks uuriti, kas ja kuidas mõjutavad ensüümiaktiivsust DNA polümorfismid ja DNA metüleerimine.

2.2 Materjalid ja metoodika

2.2.1 Valim

Uurimuse läbiviimiseks kasutati Karolinska Instituudis ja Sahlgrenska Ülikooli haiglas kogutud indiviidide maksakoest eraldatud tsütosooli ja genoomset DNA-d. 145-l indiviidil (72 meest, 70 naist, 3 inimese sugu polnud teada, vanusevahemik 13-85 aastat) mõõdeti TPMT aktiivsust, nendest 116-l määrati TPMT genotüüp (57 meest, 59 naist, vanusevahemik 13-85 aastat) ning omakorda nendest 88 indiviidil (45 meest, 43 naist, vanusevahemik 13-85 aastat) uuriti DNA 9 CpG saidi metüülatsiooniastet. Käesoleva töö raames teostatavate uuringute läbiviimiseks on doonorid andnud informeeritud nõusoleku ning olemas on vastavate Rootsi haiglate eetikakomiteede load.

2.2.2 Ensüümiaktiivsuse määramine maksast kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (*High-performance liquid chromatography, HPLC*) meetodiga

TPMT aktiivsuse määramiseks kasutatav meetod põhineb Richard M. Weinshilboumi poolt 1978. aastal välja töötatud meetodil, mis algselt oli mõeldud TPMT aktiivsuse määramiseks punastest vererakkudest (Weinshilboum jt., 1978). Käesolevas töös on kasutatud valgetest vererakkudest TPMT aktiivsuse määramise meetodit, mida Malin Lindqvist Appelli ja Anna Zimdahli on täiendanud ning kohandanud maksakoele sobivaks (Lindqvist Appell jt., 2010). Meetod põhineb teadmisel, et TPMT katalüüsib metüülühma ülekannet SAM-ilt 6-MP-le, mille tagajärjel tekib 6-metüülmerkaptopuriin (6-MeMP). Lisades reaktsioonisegusse 6-MP-d ja C^{14} -märgistatud SAM-i, tekib TPMT katalüüsitud metüülühma ülekandel C^{14} -märgistatud 6-MeMP, mille

tekkimist on võimalik jälgida radioaktiivsuse detektoriga. Tekkiva 6-MeMP hulk on seotud TPMT aktiivsusega.

2.2.2.1 Aparatuur

HPLC süsteem koosnes WatersTM 717 plus Autosampler (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA), Gynkotek P580 HPLC pumbast (Gynkotek, Germering, Saksamaa), Waters 486 Tunable Absorbance UV-VIS detektorist (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA), Jones Chromatography Model 7955 Heater Chiller kolonni soojendist (Hengoed, UK), Packard BioScience RadiomaticTM radioaktiivsuse mõõtmise detektorist (Packard, USA) ning labori arvutist. Uuritava segu kromatograafiliseks lahutamiseks kasutati kolonni Purospher STAR, RP18, osakeste läbimõõt 3 µm, 55 mm x 4 mm (MERCK, Darmstadt, Saksamaa) ja Phenomenex eelkolonni (Torrance, California, USA) Gemini C18 4 mm Lx2 mm ID filtriga (Gemini®, USA). Kromatograafi tööd kontrolliti ning andmeid koguti ja töödeldi FLO-ONE 3.65 programmi abil (PerkinElmer Life and Analytical Sciences).

2.2.2.2 Eluendi ja lahuste valmistamine

Eluendina kasutati 15% metanooli sisaldusega 20 mM kaalium divesinik fosfaatpuhvit (KH_2PO_4) pH 2,7 metanooli (*methanol*, MeOH) segu. KH_2PO_4 puhver valmistati 2,7 grammi KH_2PO_4 graanulite lahustamisel 1 L deioniseeritud vees. pH 2,7 seati kontsentreeritud fosforhappe lahusega. 850 ml kaalium puhvrile lisati 150 ml MeOH-d. 150 ml metanoolita eluenti säilitati hilisemaks kasutuseks.

Reaktsiooni initsieeriva kokteili valmistamiseks läks vaja kolme eraldi lahust, mis sisaldasid vastavalt ditiotreitooli (*dithiothreitol*, DTT), allopurinooli ja SAM-i. Nende valmistamiseks lahustati 138,8 mg DTT graanuleid 100 ml deioniseeritud vees ja 87,2 mg allopurinooli 20 ml dimetüülsulfoksiidis (*dimethyl sulfoxide*, DMSO-s). SAM-i lahuse valmistamiseks lisati 19,5 ml ^{14}C -SAM-i lahusele (PerkinElmer, Massachusetts, USA) 4,4 mg märgistamata SAM-i pulbrit (SigmaAldrich, St. Louis, MO). Kokteili valmistamiseks segati kokku 68,25 ml DTT, 9,75 ml allopurinooli ja 19,5 ml SAM-i lahust.

0,12 M 6-MP saamiseks lahustati 0,20787 g 6-MP-d 10,178 ml DMSO-s.

10 mM 6-MeMP valmistamiseks lahustati 50 °C juures 5,5 mg 6-MeMP-d ($M=166,2$ g/mol) 3309 μ l 0,1 M HCl lahuses. Saadud lahust lahjendati hiljem deioniseeritud vees kuni molaarse kontsentratsioonini 20 μ M, selleks lisati 10 μ l lahusele 4990 μ l deioniseeritud vett ja jaotati alikvootidesse (50 μ l/tuub) ning säilitati -20 °C juures. Vahetult enne HPLC analüüsi valmistati 2 μ M 6-MeMP lahendus. Selleks lisati 20 μ l 20 μ M 6-MeMP-le 180 μ l metanoolita eluenti. EB lahuse valmistamiseks segati 2,5 ml 1 M Tris HCl pH=7,6, 10 μ l DTT, 250 μ l 0,1 M PMSF, 250 μ l 100% Glütserool ja 36 ml dH₂O-d.

2.2.2.3 Valgu lüsaadi valmistamine

Külmutatud maksakoest lõigati steriilse skalpelliga ~ 50 mg tükk, mis asetati 2 ml mikrotsentrifuugi tuubi. Koeproov jäeti jääle sulama ning proovile lisati 200 μ l 5mM fosfaatpuhvit pH 7,5. Proov homogeniseeriti *bullet blender* homogenisaatoriga (kiirus 8; 3 x 1 minutit). Proovile lisati 400 μ l 5 mM fosfaas puhvit pH 7,5 ning vajadusel korrati homogeniseerimise etappi. Proove tsentrifuugiti 4 °C juures 10 minutit x 800 rpm, supernatant tõsteti ümber puhtasse mikrotsentrifuugi tuubi. Tsentrifuugimise etappi korrati kaks korda. Seejärel eraldati supernatant (tsütosool) ja põhja jäänud rakud (mikrosoomi fraktsioonid). Rakud resuspendeeriti 100 mM kaalium fosfaatpuhvis pH 7,4, mis sisaldas 20% glütserooli (iga grammi koe kohta lisati 700 μ l puhvit). Lahustes määrati valgu kontsentratsioon ning jagati laiali alikvootidesse, mida säilitati -80 °C juures. TPMT ensüümiaktiivsuse määramiseks kasutati tsütosooli.

2.2.2.4 Valgu kontsentratsiooni mõõtmine tsütosoolist

Maksa biopsiatest valmistatud rakulüsaatide lõpliku valgukontsentratsiooni määramiseks kasutati Bio-Rad DC Protein Assay'd (BioRad Laboratories, Hercules, California, USA). Meetod põhineb Lowry meetodil, mille kohaselt lisatakse 5 μ l 96-*well* plaadil olevale rakulüsaadile kahte reagenti. Tulemuste kvantifitseerimiseks kasutati veise seerumalbumiini BSA (*Bovine Serum Albumine*) kalibreerimiskõverat, mis koosnes üheksast kalibreerimispunktist, mis olid ühtlaselt kontsentratsiooni väärtuse 0 mg/ml (EB) ja 3,1 mg/ml (BSA) vahele paigutatud. Valgu kontsentratsioone rakulüsaadist määrati lainepikkusel 750 nm Labsystems Multiskan RC

aparatuuri (MTX Lab Systems, Incorporated, Virginia, USA) ning Delta soft 3 programmiga (BioMetallics Incorporated, Princeton, USA). Lüsate säilitati kuni HPLC-ni -80 °C juures.

2.2.2.5 Proovi ettevalmistamine inkubeerimiseks TPMT substraadi 6-MP-ga

15 ml tuubi lisati 75 µg valgulüsate ning lisati deioniseeritud vett kuni ruumalani 302,4 µl. Proovide inkubatsiooniks ettevalmistamiseks lisati igasse tuubi 62,5 µl 0,3 M fosfaatpuhvrit pH 7,5 ja 10 µl 0,12 M 6-MP-d (lõppkontsentratsioon proovis 3 mM). Negatiivsesse kontrollproovi lisati 10 µl 6-MP asemel 10 µl DMSO-t. Proove segati vortexil ja asetati 5 minutiks loksuvasse veevanni 37 °C juurde. Reaktsiooni initsieerimiseks lisati igasse tuubi 25 µl kokteili [10% allopurinool 4,36 mg/ml DMSO-s lahustatud, 70% DTT 1,39 mg/ml, 20% 800 µl SAM (¹⁴C märgistatud ja märgistamata) 10 µM] ning proove inkubeeriti kaks tundi loksuvas 37 °C veevannis. Reaktsioon peatati sadestamisel 2 ml atsetonitriiliga (*acetonitrile*, ACN). Proovidele lisati 20 µl 3,3 M kaaliumkarbonaadi (K₂CO₃) lahust, segati vortexil ja faaside eraldamiseks tsentrifuugiti 5 minutit x 1000 rpm 20 °C juures. Protsessi käigus eraldus kaks kihti, ülemine ehk orgaanika kiht (2 ml) tõsteti puhtasse 15 ml tuubi. Proovidele lisati 1 ml ACN-i, segati vortexil ja tsentrifuugiti veel 5 minutit x 1000 rpm 20 °C juures. Eelnevalt eraldatud 2 ml lisati veel 1 ml orgaanika kihti ning proovid puhuti õhuvooluga kuivaks (evapoeeriti) 37 °C juures kuni proovi ruumala oli alla 100 µl. Proovidele lisati kuni lõppruumalani 100 µl eluenti (20 mM KH₂PO₄ pH 2,7), resuspendeeriti ja tõsteti ümber puhtasse tuubi, tsentrifuugiti 5 minutit x 10000 rpm 6 °C juures, pärast mida tõsteti proovid HPLC tuubi.

2.2.2.6 HPLC tingimused 6-MP ja 6-MeMP määramiseks

6-MeMP sisaldust analüüsiti lainepikkusel 290 nm. Eelnevalt soojendatud (30 °C) kolonni süstiti 50 µl proovi. Eluendina kasutati 15%-lise metanooli sisaldusega 20 mM KH₂PO₄ pH 2,7 puhvrit ja eluendi voolukiiruseks oli 0,5 ml/min, detekteerimisaeg proovi kohta oli 15 minutit. Reaktsiooni käigus tekkinud 6-MeMP hulka näitas ~10 min juures esineva piigi alla jääv ruumala. Enne igat HPLC analüüsi maksaproovidega teostati retentsiooniaja teada saamiseks kontrollkatse 6-MeMP-ga. Piikide märkimine teostati käsitsi ning programm arvutas välja piigi alla jääva ruumala, kasutades ühikuna loenduste arvu/ minutis (*counts per minute*, CPM). Iga proovide

mõõtmise tsükli jaoks koostati kalibreerimisgraafik, kus 6-MeMP kontsentratsioon oli vahemikus 0,43-4,59 μM (2,86-30,63 U). Kalibreerimisgraafiku proove ei inkubeeritud. Iga mõõtmise korral võeti kontrolliks ka üks nullproov, millele 6-MeMP ei lisatud, ja üks kvaliteedikontrolliproov, millest TPMT aktiivsust mõõdeti kõikidel erinevatel päevadel teostatud mõõtmise tsüklitel. Nullproovi ja kvaliteedikontrolliproovi inkubeeriti ja valmistati analüüsiks ette nii nagu analüüsitavaid proove. Inkubeeritavaid proove võeti 3 paralleeli. 6-MeMP sisaldused analüüsitavates proovides leiti pärast kahetunnist inkubeerimist 37 °C juures kalibreerimisgraafiku abil. Ensüümiaktiivsus on väljendatud ühikutes (*unit*, U). 1 U-le vastab 1 μM 6-MeMP moodustumine ng maksa tsütosooli koguvalgu sisalduse kohta kahetunnise inkubatsiooni jooksul. Analüüse teostati 13 erineval päeval.

2.2.3 DNA metülatsiooni analüüs *Infinium HumanMethylation450 BeadChip* metülatsioonikiibiga

Spetsiaalselt disainitud oligonukleotiidkiipe kasutatakse, et kvantifitseerida huvipakkuvates genoomi positsioonides bisulfit-indutseeritud tsütosiini muutusi tümidiniiks. Esmalt toimub genoomse DNA töötlemine naatriumbisulfitiga, mis muudab metüleerimata tsütosiini uratsiiliks, aga ei muuda metüleeritud tsütosiine. Sel viisil saab eristada metüleeritud ja metüleerimata DNA-d. Seejärel produkt märgistatakse fluorestsentsmärgisega ja hübridiseeritakse kiibil olevatele spetsiifiliselt disainitud oligonukleotiidproovidele.

Eksperimentide teostamiseks kasutati *Infinium HumanMethylation450 BeadChip* komplekti (Illumina, Inc., USA), millega saab üle genoomi analüüsida 450 000 CpG saidi metülatsioonitaset, kuid käesolevas töös keskenduti 9-le TPMT geeniga seotud CpG saidile. Esimeseks etapiks oli genoomse DNA (500 ng) töötlus bisulfitiga, milleks kasutati EZ DNA Methylation™ kitti (*Zymo Research Corporation, USA*) vastavalt tootja protokollile. Bisulfiti reaktsioon viidi läbi Applied Biosystems'i Veriti termotsükleris järgnevatel tingimustel:

| Temperatuur | Aeg | |
|-------------|--------|--------------|
| 95°C | 30 sek | } 16 tsüklit |
| 50 °C | 60 min | |
| 4 °C | hold | |

Järgnes puhastusetapp, kus Zymo-Spin™ IC kolonni lisati 600 µl M-sidumispuhvrit ning kolonn asetati ettenähtud kogumistuubi. Lisati proov ja segati. Kolonni tsentrifuugiti täiskiirusel 30 sekundit. Kolonni lisati 100 µl M-pesupuhvrit ja tsentrifuugiti taas täiskiirusel 30 sekundit. Seejärel lisati 200 µl M-desulfoneerimise puhvrit ja lasti seista toatemperatuuril (20-30 °C) 15-20 minutit. Pärast inkubeerimist tsentrifuugiti kolonni täiskiirusel 30 sekundit. Kolonni pesti kaks korda 200 µl M-pesupuhvriga ja tsentrifuugiti täiskiirusel 30 sekundit. Kolonn asetati 1,5 ml mikrotsentrifuugi tuubi, lisati 10 µl M-elueerimispuhvrit ning DNA elueerimiseks tsentrifuugiti täiskiirusel 30 sekundit.

Pärast puhastusetappi kasutati 4 µl konverteeritud DNA-d hübridiseerimiseks Infinium HumanMethylation450 BeadChipiga (Illumina) vastavalt tootja protokollile. Signaali intensiivsuse tuvastamiseks kasutati Illumina GenomeStudio (Illumina) tarkvara. Iga CpG saidi metülatsioonitase on väljendatud beeta väärtusena, mis vastab kahe alleeli fluorestsentssignaali intensiivsuse suhtele.

Andmete töötlemiseks ja õigsuse kontrolliks kasutati vaba tarkvara R² ja Bioconductor package “minfi“-d (R package version 1.6.0). Beeta väärtused arvutati Illumina valemiga $\beta = M/(M+U+100)$. Kõrvaldati kõik CpG saidid, mille GenomeStudio tarkvaraga arvutatud p-väärtused olid suuremad kui 0,01.

2.2.4 Polümorfismide genotüpiseerimine

Genotüpiseerimiseks kasutati TaqMan SNP genotüpiseerimise komplekti (Applied Biosystems, USA) ja reaalaaja polümeraasi ahelreaktsiooni (*real-time polymerase chain reaction*, RT-PCR) mehhanismi. TaqMan SNP genotüpiseerimine põhineb DNA polümeraasi 5'-3' nukleaassel aktiivsusel. RT-PCR meetodi abil saab proove amplifitseerida ning tulemusi jälgida reaalaajas. Genotüpiseerimiseks kasutati Applied Biosystems'i poolt eelnevalt disainitud 20x Drug Metabolism Genotyping Assaysid (C>G, C__12091552_30; T>C, C__30634116_20; C>T, C____19567_20).

PCR reaktsioon viidi läbi 4 µl reaktsiooniseguga ühe proovi kohta. Kasutati *Dry-Down* DNA meetodit, mille korral plaadile pipeteeritud 4 µl genoomset DNA-d kuivatati üleöö. Seejärel lisati igale plaadil olevale proovile 4µl eelnevalt valmis segatud reaktsioonisegu.

² <http://www.r-project.org/>

Reaktsioonisegu koosnes:

1. 2 µl Maxima® Probe/ROX qPCR Master Mix (2x) #K0233 (Fermentas, Leedu)
2. 0,21 µl 20x Drug Metabolism Genotyping Assay Mix (Applied Biosystems)
3. 1,79 µl MQ ehk deioniseeritud H₂O

RT-PCR-i reaktsioonide läbiviimiseks kasutati firma Applied Biosystems reaallaja termotsüklerit 7900HT Fast Real-Time PCR System. PCR plaadi lugemiseks ning saadud tulemuste analüüsimiseks kasutati tarkvara SDS 2.4 (Applied Biosystems).

RT-PCR amplifitseerimise programm:

| | | | |
|---------------------------------------|------|-------------|--------------|
| Algne denaturatsioon: | 95°C | 10 minutit | } 50 tsüklit |
| Denaturatsioon: | 92°C | 15 sekundit | |
| Praimerite seondumine ja ekstensioon: | 60°C | 90 sekundit | |

2.3 Tulemused ja arutelu

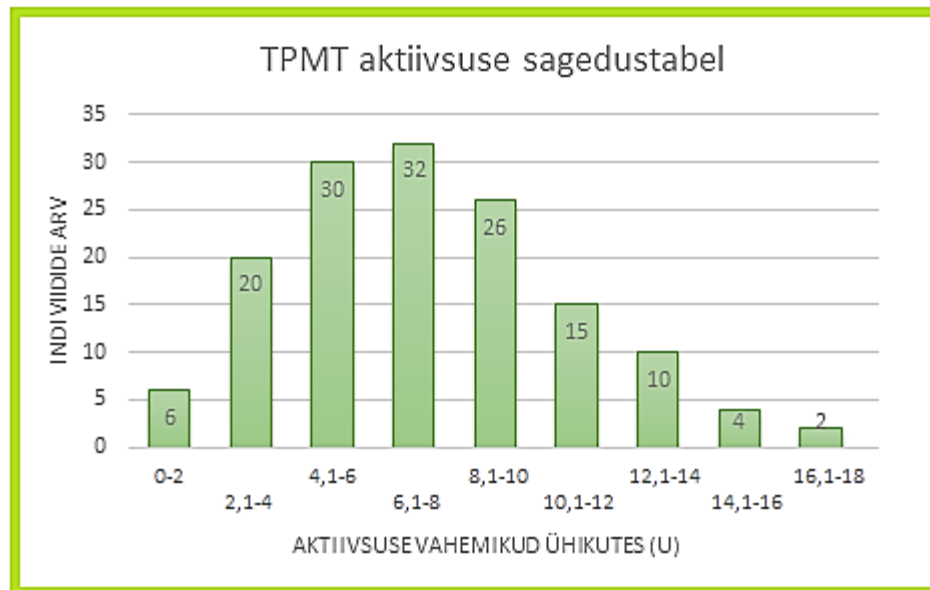
2.3.1 Tulemused

Käesoleva töö praktilise osa tulemina määrati TPMT ensüümiaktiivsus maksakoes. Lisaks määrati TPMT geeni enim levinud TPMT*2, TPMT*3B ja TPMT*3C alleelide sagedused ning uuriti 9 CpG saidi metülatsoonitaset.

2.3.1.1 Ensüümiaktiivsuse mõõtmine HPLC-ga

Antud magistritöö raames määrati 145 inimese TPMT aktiivsus maksakoes HPLC meetodiga. Valgu lüsaat valmistati ja proove inkubeeriti, nagu on kirjeldatud materjalide ja meetodite osas. 6-MeMP keskmine moodustumine kvaliteedikontrolliproovis oli $22,39 \pm 2,98$ U. Selleks, et võrrelda, kui palju erinevate päevade mõõtmistulemused üksteisest erinevad, leiti päevade vaheline varieeruvuskoeffitsient – 13 päeva vaheline varieeruvus oli 13,87 %. Lisaks uuriti ka ühe mõõtmise tsüklilisest varieeruvust. Selleks inkubeeriti kvaliteedikontrollproovi kümnes paralleelis ning leiti, et samal päeval teostatud HPLC mõõtmise tulemused erinesid 6,93% võrra.

TPMT aktiivsus 145 indiviidil varieerus vahemikus 1,15 U kuni 17,99 U (joonis 8). Meeste ja naiste TPMT ensüümiaktiivsuse erinevuse uurimisel leiti, et sugude vahel puudus statistiliselt oluline erinevus ensüümiaktiivsuses (p-väärtus=0,35).



Joonis 8. Tiopuriinmetüültransferaasi aktiivsus maksas. Ensüümiaktiivsust mõõdeti 145 indiviidil ja see on väljendatud ühikutes (U). 1U on 1µM 6-MeMP moodustumine ng maksa tsütosooli koguvalgu sisalduse kohta kahetunnise inkubatsiooni jooksul.

2.3.1.2 Genotüüpiseerimine

Indiviide uuriti kolme sagedamini esineva polümorfismi (TPMT*2, TPMT*3B, TPMT*3C) suhtes (tabel 1). Genotüüpide ja alleelide jaotuvused on toodud tabelites 2, 3 ja 4.

Tabel 1. Taqman SNP genotüüpiseerimisel uuritud polümorfismid

| Alleel | Nukleotiidne muutus | Asukoht | Aminohappe muutus |
|---------|---------------------|-----------|-------------------|
| TPMT*2 | 238C>G (rs1800462) | Ekson V | Ala80Pro |
| TPMT*3B | 460C>T (rs1800460) | Ekson VII | Ala154Thr |
| TPMT*3C | 719T>C (rs1142345) | Ekson X | Tyr240Cys |
| TPMT*3A | 460C>T (rs1800460) | Ekson VII | Ala154Thr |
| | 719T>C (rs1142345) | Ekson X | Tyr240Cys |

Tabel 2. TPMT*2 polümorfismi genotüüpide ja alleelide jaotus meestel ja naistel.

| TPMT*2 | | |
|-----------------|--------------|---------------|
| C/G | Mehed | Naised |
| N | 57 | 59 |
| Genotüüp | | |
| GG | 0 | 0 |
| CG | 0 | 0 |
| CC | 57 | 59 |
| Alleel | | |
| G | 0 | 0 |
| C | 114 (100%) | 118 (100%) |

Tabel 3. TPMT*3B polümorfismi genotüüpide ja alleelide jaotus meestel ja naistel.

| TPMT*3B | | |
|-----------------|--------------|---------------|
| C/T | Mehed | Naised |
| N | 57 | 59 |
| Genotüüp | | |
| TT | 0 | 0 |
| CT | 2 | 2 |
| CC | 55 | 57 |
| Alleel | | |
| T | 2 (1,8 %) | 2 (1,7%) |
| C | 112 (98,2%) | 116 (98,3%) |

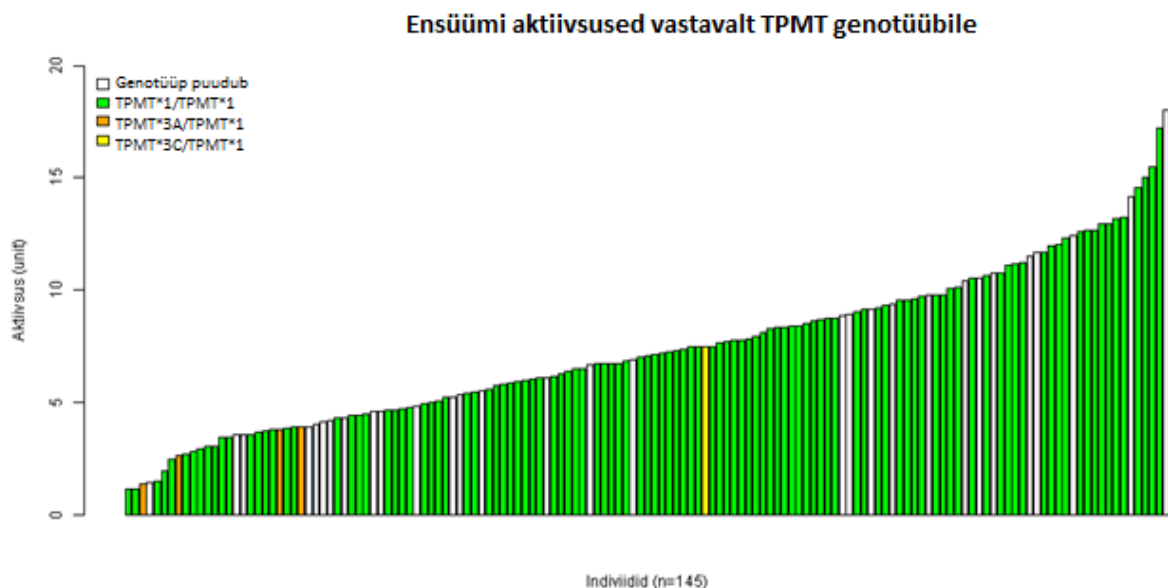
Tabel 4. TPMT*3C polümorfismi genotüüpide ja alleelide jaotus meestel ja naistel.

| TPMT*3C | | |
|-----------------|--------------|---------------|
| T/C | Mehed | Naised |
| N | 57 | 59 |
| Genotüüp | | |
| CC | 0 | 0 |
| CT | 3 | 2 |
| TT | 54 | 57 |
| Alleel | | |
| C | 3 (2,6 %) | 2 (1,7%) |
| T | 112 (97,4%) | 116 (98,3%) |

Analüüsi tulemusena leiti kokku 5 polümorfse genotüübiga indiviidi. Neljal inimesel tuvastati TPMT*3A/TPMT*1 genotüüp. Taqman SNP genotüpiseerimise abil ei ole võimalik tuvastada, kas TPMT*3B ja TPMT*3C polümorfismid asuvad koos ühel või erinevatel alleelidel, kuid reeglina päranduvad polümorfismid koos. Seega eeldati, et leitud TPMT*3A genotüübiga individid on heterosügootid. Analüüsi tulemina leiti ka üks TPMT*3C/TPMT*1 heterosügootse genotüübiga individ. TPMT*2 polümorfismi antud valimi hulgas ei tuvastatud. Uuritavad, kellel ühtegi polümorfismi ei leitud, on eeldatavasti TPMT metsiktüüpi genotüübiga.

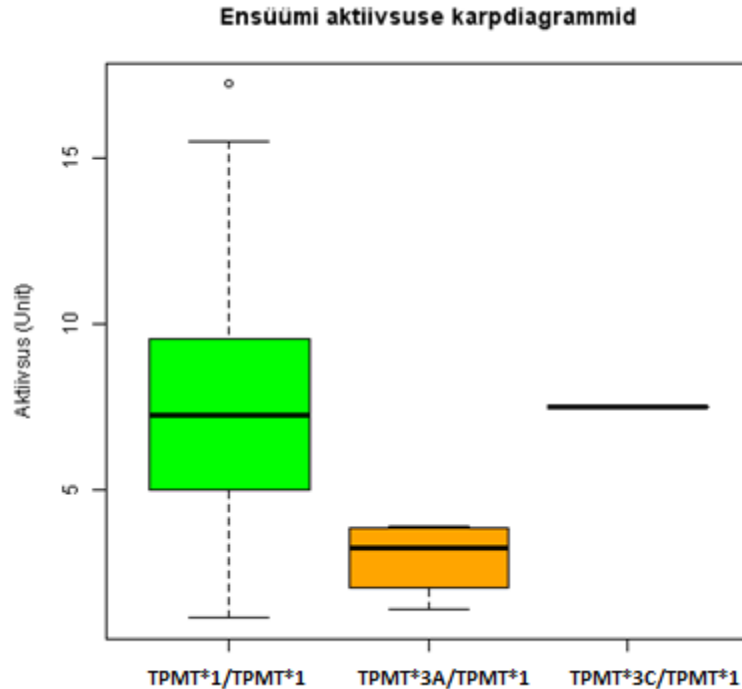
2.3.1.3 Genotüüpide seos ensüümiaktiivsusega

On teada, et polümorfismid/mutatsioonid TPMT geenis mõjutavad ensüümiaktiivsust. Käesoleva töö valimi põhjal uuriti TPMT polümorfismide mõju ensüümiaktiivsusele maksas. Joonisel 9 on kujutatud 145 indiviidi ensüümiaktiivsused vastavalt määratud genotüübile.



Joonis 9. Ensüümiaktiivsused vastavalt TPMT genotüübile. Rohelise värviga on märgitud metsiktüüpi genotüübiga individid. Kollane värv tähistab TPMT*3C/TPMT*1 heterosügootse genotüübiga isikut ja oranž värv tähistab individid TPMT*3A/TPMT*1 genotüübiga. Ensüümiaktiivsus on märgitud ühikutes (Unit). 1Unitile vastab 1µM 6-MeMP moodustumine ng maksa tsütosooli koguvalgu sisalduse kohta kahe tunni inkubatsiooni jooksul.

Selgus, et TPMT*3A/TPMT*1 genotüübiga individidel on ensüümiaktiivsus madalam kui metsiktüüpi genotüübiga individidel. TPMT*3C/TPMT*1 heterosügooti ensüümiaktiivsus on sarnane metsiktüüpi genotüübiga individide keskmisele aktiivsusele (joonis 10).



Joonis 10. TPMT polümorfismide mõju ensüümiaktiivsusele. TPMT*3A/TPMT*1 genotüübiga indiviidide ensüümiaktiivsus on oluliselt madalam (p -väärtus=0,02) kui metsiktüüpi (TPMT*1/TPMT*1) genotüübiga indiviididel. Lisaks on näha, et TPMT*1/TPMT*1 genotüübi korral varieerub ensüümiaktiivsus rohkem. Uuringu käigus leiti üks TPMT*3C/TPMT*1 genotüübiga inimene, kelle ensüümiaktiivsus oli sarnane metsiktüüpi genotüübiga keskmisele ensüümiaktiivsusele.

Aktiivsuse väärtused vastavalt genotüübile on kirjas tabelis 5. Tulemuste põhjal võib öelda, et TPMT*3A polümorfismi esinemise korral on ensüümiaktiivsus langenud.

Tabel 5. TPMT genotüüpidele vastavad ensüümiaktiivsused. 1U on 1 μ M 6-MeMP moodustumine ng maksa tsütosooli koguvalgu sisalduse kohta kahetunnise inkubatsiooni jooksul.

| Genotüüp | Indiviide arv | Aktiivsus (U) |
|----------------|---------------|-----------------|
| TPMT*1/TPMT*1 | 111 | 7,52 \pm 3,32 |
| TPMT*3C/TPMT*1 | 1 | 7,5 \pm 0 |
| TPMT*3A/TPMT*1 | 4 | 2,93 \pm 1,01 |

2.3.1.4 CpG saitide metülatsioonimustri profileerimine

TPMT geen, millelt kodeeritava ensüümi aktiivsust maksa koeproovides uuriti, asub 6. kromosoomis. Kogu geeni ulatuses paiknevad CpG saidid ning promootori ligiduses asub CpG saareke (kromosoom 6:18155534-18156354). Käesolevas töös uuriti nelja 5'-UTR-is, ühte geeni põhiosas ja nelja CpG saarekeses asuva CpG saidi metülatsioonitaset. Andmeid koguti 88

indiviidi kohta. Metülatsioonitase on väljendatud beeta (β) väärtusena – kahe alleeli fluorestsentssignaali intensiivsuse suhe. β väärtused jäävad nulli ja ühe vahele, mida suurem on β , seda suurem metülatsioonitase uuritavas CpG saidis. Nulli lähedane β väärtus tähendab, et antud CpG sait ei ole metüleeritud. Tabelis 6 on toodud CpG saitide keskmine metülatsioonitase ning saidi metülatsioonitaseme varieeruvus indiviidide vahel (dispersioon). Suurima dispersiooni väärtusega oli geeni põhiosas paiknev CpG sait cg21780842.

Tabel 6. Infinium HumanMethylation450 BeadChip metülatsioonikiibiga analüüsitud 9 CpG saiti. Metülatsioonitase on väljendatud beeta (β) väärtusena, mis vastab kahe alleeli fluorestsentssignaali intensiivsuse suhtele. Dispersioon näitab, kui palju CpG saidi metülatsioonitase indiviidide vahel varieerub.

| CpG saidi nimi | Asukoht (positsioon) | Asukoht geenil | Keskmine metülatsioonitase (β) | Dispersioon | Min | Max |
|----------------|----------------------|----------------|--|-------------|------|------|
| cg00102920 | 18156401 | 5'UTR | 0,11 | 0,001 | 0 | 0,22 |
| cg06702726 | 18152154 | 5'UTR | 0,96 | 0,007 | 0,21 | 0,98 |
| cg11007366 | 18155579 | CpG saareke | 0,01 | 0,000 | 0 | 0,12 |
| cg20677365 | 18155916 | CpG saareke | 0,56 | 0,027 | 0,20 | 0,87 |
| cg21780842 | 18136829 | geeni põhiosa | 0,72 | 0,055 | 0 | 0,92 |
| cg22406543 | 18155584 | CpG saareke | 0,23 | 0,006 | 0,11 | 0,68 |
| cg23073439 | 18155296 | 1 ekson | 0,00 | 0,000 | 0 | 0 |
| cg23860886 | 18155593 | CpG saareke | 0,01 | 0,008 | 0 | 0,83 |
| cg24342628 | 18155101 | 5'UTR | 0,08 | 0,003 | 0,03 | 0,56 |

2.3.1.5 CpG saitide metülatsiooni seos TPMT aktiivsuse ja genotüübiga

Käesoleva töö eksperimentaalosa üheks eesmärgiks oli uurida, kas ja kuidas mõjutab ensüümiaktiivsust DNA metüleerimine. Uuritavate CpG saitide metülatsioonitasemete ja ensüümiaktiivsuse vahelise korrelatsiooni olemasolu kontrollimiseks koostati hajumisdiagrammid (*scatter diagram*) ning leiti lineaarne korrelatsioonikordaja ehk Pearsoni korrelatsioonikordaja r . Korrelatsioonikordaja väärtus asub vahemikus -1 kuni 1 , mida lähemal on r absoluutväärtus ühele, seda tugevamalt on tunnused omavahel seotud. Kui kahe tunnuse vahel seost ei ole, on kordaja absoluutväärtus 0 . Pearsoni r väärtused, mille korral $|r|$ jääb vahemikku $0,7 - 1$, näitavad tugevat seost. Pearsoni r väärtused vahemikus $0,3 - 0,7$ näitavad keskmise tugevusega seost ning kui $|r| < 0,3$, on tegemist nõrga seosega³. Korrektsiooniks kasutati valevastuse määra (*false discovery rate*, FRD) 5%.

³ <http://www.tlu.ee/~kairio/failid/konspekt2.pdf>

Koostatud diagrammidelt on näha, et töösse valitud CpG saitide metülatsioonitaseme ja ensüümiaktiivsuste vahel ei ole tugevat korrelatsiooni (vaata lisa 2 joonis 1-9) (tabel 7). Antud töö suurim korrelatsioonikordaja väärtus oli saidi cg24342628 korral $r=0,196$, mis võiks viidata nõrgale seosele.

Tabel 7. Uuritud 9 CpG saidi metülatsioonitasemete ja ensüümiaktiivsuse vahelisi seoseid näitavad Pearsoni r väärtused. Arvutatud r väärtused asuvad lõigus -1 kuni 1 ja peegeldavad kahe andmehulga lineaarse seose ulatust.

| CpG sait | Pearson r |
|------------|-------------|
| cg00102920 | 0,035 |
| cg06702726 | 0,071 |
| cg11007366 | -0,158 |
| cg20677365 | 0,056 |
| cg21780842 | -0,165 |
| cg22406543 | -0,028 |
| cg23073439 | 0,082 |
| cg23860886 | -0,099 |
| cg24342628 | 0,196 |

2.3.2 Arutelu

Varieeruva ravimivastuse kujunemisele annavad panuse mitmed faktorid, nende hulgas indiviidi vanus, sugu, kehamassiindeks, populatsiooniline päritolu, koostoimed teiste samaaegselt manustatavate ravimitega, haiguse olemus, keskkonnafaktorid ning patsiendi üldine tervislik seisund. Farmakogeneetika areng on võimalikuks teinud raviplaanide kohandamise vastavalt genotüübile ehk individuaalse ravimidoosi määramise. Kuna tihti kasutatakse haigustega võitlemisel mitut erinevat ravimit samaaegselt, siis peab raviplaani optimeerimisel arvestama mitmete geneetiliste markeritega, mis võivad vastavate ravimite toimet mõjutada. Lisaks tuleb meeles pidada, et kombinatsioonravi korral võib esineda ravimite koostoime probleem. Kliinilises praktikas kasutatakse patsientidele optimeeritud ravimidooside määramiseks erinevaid diagnostilisi teste.

Käesoleva töö eesmärgiks oli määrata 145-l indiviidil TPMT ensüümiaktiivsus maksas ning uurida polümorfismide mõju ensüümiaktiivsusele. Lisaks taheti teada, kas ja kuidas mõjutab DNA metüleerimine TPMT aktiivsust maksakoes. Maks on peamine organ, kus toimub ravimite metabolism. See lisab väärtust antud tööle, kus ensüümiaktiivsusi on maksast määratud.

Mitmetes uuringutes on analüüsitud TPMT aktiivsuse soospetsiifilisust. Sugudevahelise ensüümiaktiivsuse erinevuses ei ole suudetud kokkuleppeni jõuda, vaid erinevad grupid on saanud vastuolulisi tulemusi. Ühed väidavad, et meestel on ensüümiaktiivsus kõrgem kui naistel ning teised sellist erinevust ei tuvasta (Woodson jt., 1982; Chocair jt., 1993; Alves jt., 2001; Brouwer jt., 2005; Serpe jt., 2009). Käesolevas töös statistiliselt olulist erinevust meeste ja naiste TPMT ensüümiaktiivsuses ei esinenud (p -väärtus=0,35).

Lisaks soole on vaadatud ka vanuse mõju TPMT aktiivsusele ning ühes uuringus tuvastati meessoost uuritavatel ensüümiaktiivsuse kõikumine erinevates vanusegruppides (Serpe jt., 2009). Antud töös east sõltuvat ensüümiaktiivsuse mustrit uuritavate meessoost indiviide korral ei täheldatud.

Parimateks diagnostiliste väärtusega markeriteks on TPMT geenis esinevad polümorfismid, mille seost alanenud ensüümiaktiivsusega ning sellest lähtuvalt raviefektiivsusega on tõestatud mitmetes uuringutes (viited lisa 1, tabel 1). Käesolevas töös määrati 145 inimese TPMT aktiivsus ning nendest 116 indiviidi jaoks oli olemas ka genoomne DNA, mida kasutati kolme sagedasima TPMT polümorfismi (TPMT*2, TPMT*3B, TPMT*3C) genotüpiseerimiseks. Sooviti vaadata, kas TPMT geenis esinevatel polümorfismidel on maksas ensüümiaktiivsust alandav toime. Antud töös leitud polümorfismide mõju ensüümiaktiivsusele langeb kokku varasemate uuringute tulemustega, kus hinnati genotüübi mõju punastest vererakkudest mõõdetud ensüümiaktiivsusele. Antud uuringu käigus leiti neli indiviidi TPMT*3A/TPMT*1 genotüübiga, kellel kõigil oli ensüümiaktiivsus oluliselt langenud (keskmine aktiivsus 2,93 U). Lisaks leiti üks TPMT*3C/TPMT*1 genotüübiga isik (keskmine ensüümiaktiivsus 7,5 U). Kuna polümorfismide esinemist seostatakse madalama TPMT aktiivsusega ning seda omakorda suurenenud TGN-i hulga, siis võib järeldada, et neljal TPMT*3A/TPMT*1 genotüübiga indiviidil on märgatavalt suurem oht tiopuriinide põhjustatud ravimitoksilisuse kujunemiseks. Sellise genotüübiga patsientidel tuleks kaaluda ravimi madalama doosi määramist. Käesolevas töös uuritud indiviidide hulgas leidis palju selliseid inimesi, kelle genotüübis kolme uuritud polümorfismi ei tuvastatud, kuid mõõdetud ensüümiaktiivsus oli madal.

Eeldati, et indiviidid, kellel kolme enim levinud polümorfismi ei esinenud, on metsiktüüpi genotüübiga ning nende ensüümiaktiivsus varieerus 1,147 U kuni 17,21 U. Selles grupis leitud madala ensüümiaktiivsusega isikutel võib esineda mõni haruldane polümorfism, mida seostatakse aktiivsuse langusega, kuid geneetilised muutused üksi ei pruugi olla nii suure varieeruvuse

põhjustajaks. Lisaks TPMT geenis esinevatele muutustele on leitud ka teisi TPMT aktiivsust mõjutavaid faktoreid – SAM ja selle biosünteesis osalevad komponendid (Milek jt., 2009; Karas-Kuzelicki jt., 2010). Samas TPMT geneetiline varieeruvus ning muud teadaolevad ensüümiaktiivsust mõjutavad tegurid ei suuda täielikult seletada erinevusi ensüümiaktiivsuses – näiteks homosügootsete metsiktüüpi genotüübiga (TPMT*1/TPMT*1) inimeste vahelist suurt ensüümiaktiivsuse varieeruvust või polümorfse heterosügootse genotüübiga indiviididel tuvastatud normaalset ensüümiaktiivsust (Hindorf ja Lindqvist Appell, 2012). Seega on alust arvata, et lisaks geneetilistele faktoritele mõjutavad ensüümiaktiivsust ka muud, veel tuvastamata markerid.

TPMT on oluline tiopuriinravimite põhjustatud toksilisuse määraja, kuid tänaseni ei teata, mis on selle ensüümi substraadiks rakus. ning seega jääb ka bioloogiline roll ebaselgeks. Selle ensüümi tähtsuse väljaselgitamiseks on tehtud katseid *knockout*-hiirtega, kellel on kas ühel või mõlemal alleelil geen väljalülitatud (TPMT-/+ , TPMT -/-). Hiirtel teostati farmakokineetilisi ja farmakodünaamilisi uuringuid merkapropuriini (6-MP) ja 6-tioguaaniiniga (6-TG) ning saadud tulemusi võrreldi genotüüpide vahel. Selgus, et hiired erinesid sõltuvalt genotüübist tekkivate ravimi aktiivsete metaboliitide poolest. Samas puudus genotüüpidel mõju fenotüübile, kui ravimeid ei kasutatud (Hartford jt.,2007). Bioloogilise rolli tuvastamine võiks aidata kaasa ensüümiaktiivsust mõjutavate faktorite identifitseerimisele.

Teatakse, et ravimivastuse kujunemisel on oluline roll ka epigeneetilistel protsessidel nagu kromatiini struktuuri modifitseerimine ja DNA metüleerimine. Epigeneetiline geeniekspressiooni regulatsioon on dünaamiline ja pöörduv protsess, mis määrab raku normaalse fenotüübi ning mängib rolli ka mitmete haiguste tekkel (Arrowsmith jt., 2012). Epigeneetiline geeniregulatsioon võib mõjutada ravimeid metaboliseerivate geenide ekspressiooni ja seeläbi ravimivastust (Kacevska jt., 2011). Samas tuleb silmas pidada, et epigeneetiline geeniregulatsioon on mõjutatav keskkonnafaktorite poolt, mille hulka kuuluvad ka ravimid. Seega on võimalik, et geeni epigeneetiline muster võib muutuda ravimite toimetel.

Käesolevas töös püstitati hüpotees, et just epigeneetilised faktorid võivad põhjustada ensüümiaktiivsuse varieeruvust. Uuriti DNA 9 CpG saidi metülatsoonitaseme mõju TPMT aktiivsusele. Analüüsitud üheksast CpG saidist 8 asusid geeni 5'-UTR piirkonnas ja nendest 4 seal paiknevas CpG saarekeses. See osa geenist, kus asub nii promootor kui ka TSS, on tavaliselt metüleerimata ning kui see piirkond muutub metüleerituks, siis inhibeeritakse geeniekspressioon.

Analüüsi tulemused näitasid, et enamus 5'-UTR piirkonna CpG saitidest olid madala metülatsioonitasemega (keskmise metülatsioonitase 0,00 β kuni 0,23 β). CpG saarekeses asuva cg20677365 saidi ja 5'-UTR-is paikneva cg06702726 saidi keskmised metülatsioonitasemed olid mõnevõrra kõrgemad (0,56 β ja 0,96 β vastavalt). Kõikide CpG saitide analüüsil leiti, et indiviiditi erinesid metülatsioonitasemed kahes saidis rohkem – CpG saarekeses olevas cg20677365 ja geeni põhiosas paiknevas cg2178084 saidis. Ülejäänutes oli uuritavate vaheline metülatsioonitaseme erinevus väiksem (cg00102920; cg06702726; cg11007366; cg22406543; cg23073439; cg23860886; cg24342628) (tabel 6). Samas ei tuvastatud ühegi 5'-UTR piirkonna ja CpG saarekeses asuva CpG saidi metülatsioonitaseme ja ensüümiaktiivsuse vahel korrelatsiooni. Kõrgeim korrelatsioonikordaja väärtus oli 0,196 saidis cg24342628, ent seose kindlaks tegemiseks tuleks uuringut korrata suurema valimiga.

Metülatsiooni mõju geeniekspressioonile ei ole üheselt mõistetav ja sõltub suuresti metüleeritud CpG saidi asukohast. TSS-i vahetus läheduses paiknev CpG metülatsioon blokeerib transkriptsiooni initsiatsiooni, kuid metüleeritud CpG geeni põhiosas ei pruugi geeniekspressioonile pärssivat mõju avaldada, vaid hoopis transkriptsiooni elongatsiooni etappi stimuleerida (Jones, 2012). Lisaks on leitud, et geeni põhiosas asuvate CpG saitide metülatsioon mõjutab splaissingut (Moarefi ja Chedin, 2011). Ka antud magistritöösse oli valitud üks CpG sait, mis asub geeni sees (cg21780842) ja mille keskmine metülatsioonitase oli suhteliselt kõrge (0,72 β). Samas leiti, et mainitud CpG saidi metülatsioonitasemel puudus korrelatsioon ensüümiaktiivsusega ($r=-0,165$). DNA metülatsiooni uurimiseks kasutati Infinium HumanMethylation450 BeadChip metülatsioonikiipi, kuhu CpG saidid on valitud esimese eksoni promootori piirkonna järgi. Samas on teada, et TPMT geeni kodeeriv piirkond on 3. kuni 10. eksonini ning tulevikus tasuks vaadata, kas geeni kodeeriva piirkonna CpG saitide metülatsioonitase võiks ensüümiaktiivsust mõjutada.

Ühe võimalusena seletamaks ensüümiaktiivsuse varieeruvust tuleb kaaluda kasutatavate ravimite koostoimete mõju, sest tihti kasutatakse haigustega võitlemisel ravi efektiivsuse suurendamiseks kombineeritud ravi. Näiteks on teada, et IBD raviks kasutatavad kortikosteroidid sulfasalasiin ja mesalamiin inhibeerivad TPMT aktiivsust. Neid ravimeid kasutatakse põletikumediaatorite produktsiooni pärssimiseks ning samal ajal kasutakse põletikuga võitlemiseks ka immuunsupressiivseid tiopuriinravimeid (Khan jt., 2011). Ravimite ristmõju tagajärjel langeb TPMT aktiivsus, mis suurendab tiopuriinravimite põhjustatud toksilisuse tekkeriski. Seega ei

põhjusta üksnes muutused TPMT geenis madalat ensüümiaktiivsust ja ravimite kõrvaltoimeid, vaid süüdlaseks võib olla hoopis ravimite rismõju.

Eelneva põhjal võib väita, et ravivigade vältimiseks oleks vajalik patsientide genotüpiseerimine või ensüümiaktiivsuse määramine enne tiopuriinravi alustamist, mida tänapäeval ka mitmetes haiglates enne tiopuriinravi alustamist teostatakse. Ensüümiaktiivsuse mõõtmisteks kasutatakse tavaliselt punaseid vererakke ning mitmed uuringud, mis on läbi viidud erinevate etniliste gruppide hulgas, on leidnud, et punastest vererakkudest ja maksast mõõdetud TPMT aktiivsus on omavahel tugevas korrelatsioonis. Kahjuks ei olnud võimalik käesoleva töö raames uuritud indiviidide TPMT ensüümiaktiivsust punastest vererakkudest mõõta. Kohordi eripärast tulenevalt antud töös TPMT aktiivsusele iseloomulikku trimodaalset jaotust ei esinenud, küll aga leiti tugev seos madala aktiivsuse ja polümorfismide vahel. Samuti ei leitud 9 CpG saidi metülatsioonitasemel seost aktiivsusega, kuid nende tulemuste põhjal ei saa teha üldistavaid järeldusi, nagu DNA metüleerimine ei võiks olla põhjuseks, miks kindla genotüübiga indiviidide grupi sisene ensüümiaktiivsus suurel määral varieerub. Kindlasti tasub uurida DNA metüleerimise mõju suuremas ulatuses ning vaadata rohkemate CpG saitide metülatsioonitasemeid. Erilist tähelepanu tuleks pöörata just sellistele CpG saitidele, kus tuvastatakse suur indiviidide vaheline varieeruvus. Lisaks oleks huvitav vaadata kogu geeni metülatsioonimustrit enne ja pärast tiopuriinravi alustamist, et hinnata kasutatavate ravimite mõju DNA metüleerimisele.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö kirjanduse osas anti ülevaade tiopuriinmetüültransferaasi (TPMT) ensüümist, millel on keskne roll tiopuriinravimite metabolismil. Ensüümiaktiivsus aitab ennustada ravi tulemuslikkust. Mainitud ravimeid kasutatakse ägeda lümfoidse leukeemia ja põletikuliste soolehaiguste raviks. TPMT kaudu metaboliseerudes moodustuvad ravimi inaktiivsed metaboliidid. Ensüümiaktiivsuse langus põhjustab aktiivsete metaboliitide kuhjumist organismi, mis võib patisentidel eluohtlike ravimikõrvalnähte põhjustada. Lisaks kirjeldati TPMT geneetilisi polümorfisme, mis mõjutavad ensüümiaktiivsust ja ravi efektiivsust. Lühidalt kirjeldati ka ravimeid metaboliseerivate ensüümide farmakogeneetikat ning anti ülevaade epigeneetilisest geeniekspressiooni regulatsioonist.

Töö praktilise osa eesmärgiks oli määrata TPMT geeni kolme levinuma polümorfismi esinemissagedus uuritavas populatsioonis ning vaadata, kas polümorfised genotüübid mõjutavad TPMT aktiivsust maksas. Analüüsi käigus leiti neli TPMT*3A/TPMT*1 ja üks TPMT*3C/TPMT*1 genotüübiga indiviid. TPMT*3A/TPMT*1 genotüübiga isikute ensüümiaktiivsus maksas oli oluliselt madalam metsiktüüpi (TPMT*1/TPMT*1) genotüübiga inimeste omast. TPMT*3C/TPMT*1 genotüüp ensüümiaktiivsust märgatavalt ei mõjutanud. Kogutud andmete põhjal võib väita, et TPMT*3A/TPMT*1 genotüüp põhjustab ensüümiaktiivsuse langust. Sellise genotüübiga indiviididel on suurem oht tiopuriinide põhjustatud ravimitoksilisuse kujunemiseks ning neil tuleks kaaluda ravi standarddoosist madalama annusega. Lisaks geneetilistele faktoritele uuriti ka DNA metüülatsiooni mõju TPMT aktiivsusele. Töösse valiti neli 5'-UTR piirkonnas, neli CpG saarekeses asuvat CpG saiti ja üks geeni põhiosas paiknev CpG sait, millede metüülatsioonisaset mõõdeti ning seost aktiivsusega vaadati. Käesoleva töö käigus ei leitud antud saitide ja ensüümiaktiivsuse vahel seost.

Käesoleva töö põhjal võib väita, et TPMT geeni polümorfismide põhjal saab ennustada tiopuriinide ravimivastust, kuid usaldusväärsemate tulemuste saamiseks tuleks täiendavalt määrata ka fenotüüp st. ensüümi aktiivsus, kuna uuritud polümorfismid üksi ei põhjusta ensüümiaktiivsuse langust. Lisaks leiti uuritud CpG saitide põhjal, et DNA metüülatsioon ei avaldanud mõju ensüümiaktiivsusele. Nende tulemuste põhjal ei ole võimalik järeldada, et DNA metüleerimine ei mõjuta ensüümiaktiivsust, vaid tulevikus tasuks TPMT geeni metüülatsioonimustrit ulatuslikumalt uurida.

Factors Influencing the Activity of Thiopurine Methyltransferase in Human Liver

SUMMARY

Research in pharmacogenetics investigates how differences in our genes can affect our response to medicines. The thiopurines are prodrugs which require metabolic transformation to exert effect. These drugs are used in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia and inflammatory bowel disease.

Thiopurine methyltransferase (TPMT) is an important enzyme involved in the metabolism of thiopurines. Genetic polymorphisms that affect TPMT enzymatic activity are correlated with variations in the therapeutic response and thiopurine-induced toxicity within individuals. The frequency distribution of TPMT activity in Caucasians is trimodal, with 89% having high enzyme activity, 10% having intermediate activity and 1 of 300 having almost undetectable activity.

TPMT gene exhibits significant genetic polymorphism. At present, a total of 36 TPMT genetic polymorphisms (single nucleotide polymorphisms, SNP), have been identified. Several SNPs cause decreased enzyme activity. TPMT*1 is the wild-type allele. The most common SNPs are TPMT*2, TPMT*3A and TPMT*3C. Patients with low TPMT activity are at high risk of severe, eventually fatal, haematologic toxicity. Therefore, the level of TPMT enzyme activity is essential for balance of therapeutic and toxic effects of thiopurine drug dose.

In the research done in the framework of the current master's thesis the pharmacogenetics and epigenetics of TPMT were studied. TaqMan® SNP Genotyping Assays and Infinium HumanMethylation450 BeadChip were used for analyzing the impact of the most common SNPs and DNA methylation on TPMT activity. The study identified 4 individuals who were heterozygous for TPMT*3A/TPMT*1 genotype and had decreased TPMT activity. In addition 1 person with TPMT*3C/TPMT*1 genotype was found, whose enzyme activity was not influenced by the TPMT*3C polymorphism. Collected data suggest that TPMT*3A/TPMT*1 genotype results in the decrease of enzyme activity and individuals with TPMT*3A/TPMT*1 genotype are at greater risk of developing thiopurine-caused drug toxicity. They should be treated with lower drug doses. The impact of DNA methylation on enzyme activity was examined in addition to genetic factors. The methylation levels of 4 CpG sites located in 5'-UTR region, 4 sites within

the CpG Island, and one in the gene body region were analyzed – there was no correlation between the methylation levels of these sites and the enzyme activity.

We suggest that the TPMT gene polymorphism can be predictive of enzyme activity, and thereby thiopurine drug response. However, in order to obtain more reliable diagnostic results, the phenotype should be determined in addition to genotype, since the polymorphisms are not the only factors that may cause variability and decrease in TPMT activity. Moreover, based on studied 9 CpG sites is possible to make conclusion as if DNA methylation has no effect on enzyme activity. However, this would be presumptuous, because in order to determine the impact of DNA methylation on TPMT activity, the TPMT gene methylation patterns should be studied more extensively.

TÄNUAVALDUSED

Tahaksin väljendada oma suurimat tänu juhendajatele, Riin Tammele ja Lili Milanile. Lisaks olen abi ja toetuse eest südamest tänulik Malin Lindqvist Appellile ja Anna Zimdahlile.

Suured tänusõnad ka biotehnoloogia labori kollektiivile ning kõigile, kes on andnud panuse käesoleva töö valmimiseks.

Rita Reim, Martin Reim, Akis Kracht ja Helen Lempu, suur aitäh ka Teile. Olete vapralt minu töö valmimise kõrval olnud ning nii rasketel kui rõõmsatel hetkedel julgustavaid sõnu osanud leida.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Adam de Beaumais**, T. and Jacqz-Aigrain, E. (2012). Pharmacogenetic determinants of mercaptopurine disposition in children with acute lymphoblastic leukemia. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 68(9): 1233-1242.
- Allan**, P. W. and Bennett, Jr. L. L., (1971). 6-Methylthioguanilyc acid, a methabolite of 6-thioguanine. *Biochem. Pharmacol.* 22(4): 847-852.
- Alves**, S., Amorim, A., Ferreira, F. and Prata, M. J. (2001). Influence of the variable number of tandem repeats located in the promoter region of the thiopurine methyltransferase gene on enzymatic activity. *Clin. Pharmacol. Ther.* 70: 165–174.
- Antequera**, F. and Bird, A. (1993). Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90(24): 11995-11999.
- Aricò**, M., Valsecchi, M. G., Camitta, B., *et al.* (2000). Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome–positive acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 342:998-1006.
- Armstrong**, S. A., and Look, A. T. (2005). Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 23:6306-6315.
- Arrowsmith**, C. H., Bountra, C., Fish, P. V., Lee, K. and Schapira, M. (2012). Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nat. Rev. Dr. Disc.* 11: 384-400.
- Baumann**, P., Jonzier Perey, M., Koeb, L., *et al.* (1986). Amitriptyline pharmacokinetics and clinical response: II. Metabolic polymorphism assessed by hydroxylation of debrisoquine and mephenytoin. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 1: 102–112.
- Baumgart**, D. C. and Sandborn, W. J. (2007). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet.* 369: 1641–1657.
- Bennett**, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., *et al.* (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br. J. Haematol.* 33(4): 451-458.
- Berg**, J. M., Tymoczko, J. L. and Stryer, L. (2002). *Biochemistry*. 5th edition. 26.4.3 The Cytochrome P450 System Is Widespread and Performs a Protective Function. New York: W H Freeman.
- Bertilsson**, L., Dahl, M. L., Dalen, P. and Al-Shurbaji, A. (2002). Molecular genetics of CYP2D6: clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 53: 111–122.
- Bestor**, T. H. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.* 9(16): 2395-2402.
- Bolton**, N. J., Tapanainen, J., Koivisto, M. and Vihko, R. (1989). Circulating sex hormone-binding globulin and testosterone in newborns and infants. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 31(2): 201-107.
- Boyes**, J. and Bird, A. (1992). Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J.* 11: 327–333.
- Brouwer**, C., De Abreu, R. A., Keizer-Garritsen, J. J., *et al.* (2005). Thiopurine methyltransferase in acute lymphoblastic leukaemia: biochemical and molecular biological aspects. *Eur. J. Cancer.* 41: 613–623.

Bökkerink, J. P., Stet, E. H., De Abreu, R. A., et al. (1993). 6-Mercaptopurine: cytotoxicity and biochemical pharmacology in human malignant T-lymphoblasts. *Biochem. Pharmacol.* 45(7): 1455-1463.

Cheok, M. H. and Evans, W. E. (2006). Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 6(2): 117-129.

Chocair, P. R., Duley, J. A., Sabbaga, E., et al. (1993). Fast and slow methylators: do racial differences influence risk of allograft rejection? *Q. J. Med.* 86: 359-363.

Chua, E. W. and Kennedy, M. A. (2012). Current state and future prospects of direct-to-consumer pharmacogenetics. *Frontiers in Pharmacol. Pharmacogenetics and Pharmacogenomics.* 3(152): 1-8.

Comb, M. and Goodman, H. M. (1990). CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucl. Ac. Res.* 18: 3975-3982.

Crews, K. R., Hicks, J. K., Pui, C. H., et al. (2012). Pharmacogenomics and Individualized Medicine: Translating Science Into Practice. *Clinical Pharmacology and Practice* 92: 467-475.

Davie, J. R. and Candido, E. P. (1978). Acetylated histone H4 is preferentially associated with template-active chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 3574-3577.

Dou, Y. and Gorovsky, M. A. (2002). Regulation of transcription by H1 phosphorylation in Tetrahymena is position independent and requires clustered sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 6142-6146.

Elion, G. B. (1989). The purine path to chemotherapy. *Science (new York NY).* 244: 41-47.

Elion, G. B., Hitchings, G. H. and Vanderwerff, H. (1951). Antagonists of nucleic acid derivatives. VI. Purines. *J. Biol. Chem.* 192: 505-518.

Evans, W. E. and McLeod, H. L. (2003). Pharmacogenomics- drug disposition, drug targets, and side effects. *N. Engl. J. Med.* 348: 538-549.

Evans, W. E. and Relling, M. V. (2004). Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. *Nature.* 429: 464-468.

Evans, W. E., Hon, Y. Y., Bongaars, I., et al. (2001). Preponderance of thiopurine S-methyltransferase deficiency and heterozygosity among patients intolerant to mercaptopurine or azathiopurine. *J. Clin. Oncol.* 19: 2293-2301.

Felsenfeld, G. and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature*, 421: 448-453.

Feng, Q., Vannaprasaht, S., Peng, Y., et al. (2010). Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: functional characterization of a novel rapidly degraded variant allozyme. *Biochem. Pharmacol.* 79: 1053-1061.

Ferreri, A. J., Dell'Oro, S., Capello, D. et al. (2004). Aberrant methylation in the promoter region of the reduced folate carrier gene is a potential mechanism of resistance to methotrexate in primary central nervous system lymphomas. *Br. J. Haematol.* 126: 657-664.

Fessing, M. Y., Belkov, V. M., Krynetski, E. Y. and Evans, W. E. (1998). Molecular cloning and functional characterization of the cDNA encoding the murine thiopurine S-methyltransferase (TPMT). *FEBS Lett.* 424(3): 143-145.

Filippakopoulos, P., Picaud, S. and Mango, M. (2012). Histone Recognition and Large-Scale Structural Analysis of the Human Bromodomain Family. *Cell.* 149(1): 214-231.

Finch, J. T., Lutter, L. C., Rhodes, D., et al. (1977). Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature.* 269: 29-36.

Fiocchi, C. (1998). Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterol.* 115: 182-205.

- Ford**, A. C., Moayyedi, P., Hanauer, S. B. and Kirsner, J. B. (2013). Ulcerative colitis. *BMJ*. 346:f432.
- Fotoohi**, A. K., Coulthard, S. A. and Albertoni, F. (2010). Thiopurines: Factors influencing toxicity and response. *Biochem. Pharmacol.* 79: 1211-1220.
- Freeman**, H. J. (2003). Natural history and clinical behavior of Crohn's disease extending beyond two decades. *J. Clin. Gastroenterol.* 37 (3): 216-219.
- Garat**, A., Cauffiez, C., Renault, N., *et al.* (2008). Characterisation of novel defective thiopurine S-methyltransferase allelic variants. *Biochem. Pharmacol.* 76: 404-415.
- Gaynon**, P. S. (2005). Childhood acute lymphoblastic leukaemia and relapse. *British J. of Haematol.* 131: 579-587.
- Ghotbi**, R., Gomez, A., Milani, L. *et al.* (2009). Allele-specific expression and gene methylation in the control of CYP1A2 mRNA level in human livers. *Pharmacogenomics J.* 9, 208–217.
- Gilbert**, S. F. (2010). *Developmental biology*. (9th ed.). Sinauer Associates, Inc. 35-37.
- Goldstein**, D. B., Tate, S. K. and Sisodiya, S. M. (2003). Pharmacogenetics goes genomic. *Nat. Rev. Genet.* 4: 937-947.
- Guercioli**, R., Szumlanski, C. and Weinshilboum, R. M. (1991). Human liver xanthine oxidase: nature and extent of individual variation. *Clin. Pharmacol. Ther.* 50: 663-672.
- Hamdan-Khalil**, R., Allorge, D., Lo-Guidice, J. M., *et al.* (2003). In vitro characterization of four novel non-functional variants of the thiopurine S-methyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309: 1005-1010.
- Hamdan-Khalil**, R., Gala, J. L., Allorge, D., *et al.* (2005). Identification and functional analysis of two rare allelic variants of the thiopurine S-methyltransferase gene, TPMT*16 and TPMT*19. *Biochem. Pharmacol.* 69: 525-529.
- Hansen**, K. D. and Aryee, M.: Minfi: Analyze Illumina's 450k Methylation Arrays. [R package version 1.6.0].
- Hartford**, C., Vasquez, E., Schwab, M. *et al.* (2007). Differential Effects of Targeted Disruption of Thiopurine Methyltransferase on Mercaptopurine and Thioguanine Pharmacodynamics. *Cancer. Res.* 67(10): 4965- 4972.
- Henikoff**, S. and Matzke, M. A. (1997). Exploring and explaining epigenetic effects. *Trends. Genet.* 13: 293–295.
- Hindorf**, U. and Lindqvist Appell, M. (2012). Genotyping should be considered the primary choice for pre-treatment evaluation of thiopurine methyltransferase function. *J. of Crohn's and Colitis* (6)6: 655-659.
- Holliday**, R. and Pugh, J. E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*. 187(4173): 226-232.
- Hon**, Y. Y., Fessing, M. Y., Pui, C. H., *et al.* (1999). Polymorphism of the thiopurine S-methyltransferase gene in African-Americans. *Hum. Mol. Genet.* 8: 371-376.
- Jacques**, P. F., Bostom, A. G., Wilson, P. W., *et al.* (2001). Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 613–621.
- Jarnerot**, G. (1996). Future aspects on inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 220: 87–90.
- Jenuwein**, T. (2001). Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases. *Trends Cell Biol.* 11: 266–273.
- Jia**, G., Wang, W., Li, H., *et al.* (2009). A systematic evaluation of the compatibility of histones containing methyl-lysine analogues with biochemical reactions. *Cell Res.* (10): 1217-1220.

Jiang, Z., Dragin, N., Jorge-Nebert, L. F. *et al.* (2006). Search for an association between the human CYP1A2 genotype and CYP1A2 metabolic phenotype. *Pharmacogenet. Genomics* 16: 359–367.

Johnson, J. A. (2001). Drug target Pharmacogenomics. *Am J Pharmacogenomics*. 4: 271-281.

Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 13(7): 484-492.

Kacevska, M., Ivanov, M. and Ingelman-Sundberg, M. (2011). Perspectives on Epigenetics and Its Relevance to Adverse Drug Reactions. *Clin. Pharmacol. Ther.* 89 (6): 902-907.

Kalra, K., Jarmal, G. and Mishra, N. (2009). Drugs impact on CYP-450 enzyme family: A pharmacogenetical study of response variation. *Indian. J. Hum. Genet.* 15 (2): 78–83.

Karas-Kuzelicki, N., Milek, M. and Mlinaric-Rascan, I. (2010). MTHFR and TYMS genotypes influence TPMT activity and its differential modulation in males and females. *Clin. Biochem.* 43: 37–42.

Karas-Kuzelicki, N. and Mlinaric-Rascan, I. (2009). Individualization of thiopurine therapy: thiopurine S-methyltransferase and beyond. *Pharmacogenomics* 10: 1309-1322.

Kass, S. U., Goddard, J. P. and Adams R. L. P. (1993). Inactive chromatin spreads from a focus of methylation. *Mol. Cell. Biol.*, 13: 7372–7379.

Keshet, I., Yisraeli, J. and Cedar, H. (1985). Effect of regional DNA methylation on gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:2560–2564.

Kham, S. K., Soh, C. K., Aw, D. C. and Yeoh, A. E. (2009). TPMT*26 (208F-->L), a novel mutation detected in a Chinese. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 68: 120-123.

Khan, K. J., Dubinsky, M. C., Ford, A. C., et al. (2011). Efficacy of immunosuppressive therapy for inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 106: 630-42.

Knutson, D., Greenberg, G. and Cronau, H. (2003). Management of Crohn's disease: a practical approach. *Am. Fam. Physician.* 68 (4): 707-714.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell.* 128: 693-705.

Krynetski, E. Y., Schuetz, J. D., Galpin, A. J., et al. (1995). A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 949-953.

Krynetski, E. Y., Tai, H. L., Yates, C. R., et al. (1996). Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase: clinical importance and molecular mechanisms. *Pharmacogenet.* 6: 279-290.

Landy, J., Bhuva, N., Marinaki, A. and Mawdsley, J. (2010). Novel thiopurine methyltransferase variant TPMT*28 results in a misdiagnosis of TPMT deficiency. *Inflamm. Bowel. Dis.* 17(6): 1441-1442.

Lee, C. K., Loh, T. P., Wong, S. T., et al. (2012). Detection of a novel single nucleotide polymorphism of the human thiopurine s-methyltransferase gene in a Chinese individual. *Drug. Metab. Pharmacokinet.* 27: 559-561.

Lennard, L., Cartwright, C. S., Wade, R., Richards, S. M. and Vora, A. (2012). Thiopurine methyltransferase genotype-phenotype discordance, and thiopurine active metabolite formation, in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Clin. Pharmacol.* doi 10.1111/bcp.12066.

Lennard, L., Gibson, B. E., Nicole, T., et al. (1993). Congenital thiopurine methyltransferase deficiency and 6-mercaptopurine toxicity during treatment for acute lymphoblastic leukaemia. *Arch. Dis. Child.* 69: 577-579.

Lennard, L., Van Loon, J. A., Lilleyman, J. S. and Weinshilboum, R. M. (1987). Thiopurine pharmacogenetics in leukemia: correlation of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations. *Clin. Pharmacol. Ther.* 41(1): 18-25.

Lessard, E., Yessine, M., Hamelin, B., et al. (1999). Influence of CYP2D6 activity on the disposition and cardiovascular toxicity of the antidepressant agent venlafaxine in humans. *Pharmacogenetics*. 9: 435-443.

Li, J. and Bluth, M. H. (2011). Pharmacogenomics of drug metabolizing enzymes and transporters: implications for cancer therapy. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. 4: 11-33.

Lindqvist Appell, M., Wennerstrand, P., Peterson, C., Hertvig, E. and Mårtensson, L-G. (2010). Characterization of a novel sequence variant, TPMT*28, in the human thiopurine methyltransferase gene. *Pharmacogenet. And Genomics*. 20: 700-707.

Lindqvist, M. (2005). Pharmacogenetic studies of thiopurines – focus on thiopurine methyltransferase. Printed in Sweden by LTAB Linköpings Tryckeri AB, 995.

Lindqvist, M., Haglund, S., Almer, S., et al. (2004). Identification of two novel sequence variants affecting thiopurine methyltransferase enzyme activity. *Pharmacogenetics*. 14: 261-265.

Lindqvist, M., Skoglund, K., Karlgren, A., et al. (2007). Explaining TPMT genotype/phenotype discrepancy by haplotyping of TPMT*3A and identification of a novel sequence variant, TPMT*23. *Pharmacogenet. Genomics*. 17: 891-895.

Loit, E., Tricco, A. C., Tsouros, S., et al. (2011). Pre-analytic and analytic sources of variations in thiopurine methyltransferase activity measurement in patients prescribed thiopurine-based drugs: A systematic review. *Clin. Biochem.* 44(10-11): 751-757.

Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. and Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 389: 251-260.

Margolin, J. F., Steuber, C. P. and Poplack, D. G. (2006). Acute lymphoblastic leukemia. In: Pizzo PA Poplack DG, eds. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. 15th ed. :538-590.

Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R. and Haaf, T. (2000). Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*. 403(6769): 501-502.

McLeod, H. L., Krynetski, E. Y., Relling, M. V. and Evans, W. E. (2000). Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 14: 567-572.

McLeod, H. L., Miller, D. R., Evans, W. E. (1993). Azathioprine-induced myelosuppression in thiopurine methyltransferase deficient heart transplant recipient. *Lancet*. 341: 1151.

Meinsma, R., Fernandez-Salguero, P., van Kuilenburg, A. B., van Gennip, A. H. and Gonzalez, F. J. (1995). Human polymorphism in drug metabolism: mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene results in exon skipping and thymine uraciluria. *DNA. Cell. Biol.* 14: 1-6.

Melchior, F. (2000). SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 16: 591-626.

Mellor, J. (2006). Dynamic nucleosomes and gene transcription. *Trends. Genet.* 22: 320-329.

Milek, M., Karas Kuzelicki, N., Smid, A., et al. (2009). S-adenosylmethionine regulates thiopurine methyltransferase activity and decreases 6-mercaptopurine cytotoxicity in MOLT lymphoblasts. *Biochem. Pharmacol.* 77: 1845-1853.

Miners, J. O. and Birkett, D. J. (1998). Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 45: 525-538.

Moarefi, A. H. and Chedin, F. (2011). ICF syndrome mutations cause a broad spectrum of biochemical defects in DNMT3B-mediated de novo DNA methylation. *J. Mol. Biol.* 409: 758-772.

- Murray**, E. J. and Grosveld, F. (1987). Site specific demethylation in the promoter of human gamma globin gene does not alleviate methylation mediated suppression. *EMBO J.* 6: 2329–2335.
- Nan**, X., Campoy, F. J. and Bird, A. (1997). MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell.* 88: 471–481.
- Nan**, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., et al. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature.* 393: 386–389.
- Neurath**, M. F. and Travis, S. P. (2012). Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: a systematic. Review. *Gut.* 61: 1619–35.
- Ng**, H. H. and Bird, A. (1999). DNA methylation and chromatin modification. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9: 158–163.
- Okano**, M., Xie, S. and Li, E. (1998). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases [letter]. *Nat. Genet.* 19: 219–220.
- Otterness**, D., Szumlanski, C., Lennard, L., et al.. (1997). Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence polymorphisms. *Clin. Pharmacol. Ther.* 62: 60–73.
- Papadakis**, K. A. and Targan, S.R. (1999). Current theories on the causes of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clin. North. Am.* 28: 283–96.
- Parks**, D. A. and Granger, D. N. (1986). Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta. Physiol. Scand. Suppl.* 548: 87–99.
- Petronis**, A. and Petroniene, R. (2000). Epigenetics of inflammatory bowel disease. *Gut.* 47(2): 302–306.
- Pham**, A. D. and Sauer, F. (2000). Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science.* 289(5488): 2357–2360.
- Present**, D. H., Korelitz, B. I., Wisch, N., et al. (1980). Treatment of Crohn's disease with 6-mercaptopurine: a long-term, randomized double-blind study. *N. Engl. J. Med.* 302 (18): 981–987.
- Preskorn**, S. H., Burke, M. J. and Fast, G. A. (1993). Therapeutic drug monitoring. Principles and practice. *Psychiatr. Clin. North. Am.* 16: 611–645.
- Pui**, C-H., Robinson, L. L. and Look, A. T. (2008). Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 371(9617): 1030–1043.
- Pui**, C-H. and Evans W. E. (2006). Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 354: 166–178.
- Pui**, C-H., Sandlund, J. T., Pei, D., et al. (2004). Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIII at St. Jude Children's Research Hospital. *Blood.* 104: 2690–2696.
- Raida**, M., Schwabe, W., Hausler, P., Van Kuilenburg, A. B., Van Gennip, A. H., Behnke, D. et al. (2001). Prevalence of a common point mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) gene within the 50-splice donor site of intron 14 in patients with severe 5-fluorouracil (5-FU)- related toxicity compared with controls. *Clin. Cancer. Res.* 7: 2832–2839.
- Razin**, A. and Cedar, H. (1977). Distribution of 5-methylcytosine in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 2725–2728
- Razin**, A. and Riggs, A. D. (1980). DNA methylation and gene function. *Science* 210: 604–610.
- Reinius**, L. E., Acevedo, N., Joerink, M., et al. (2012). Differential DNA methylation in purified human blood cells: implications for cell lineage and studies on disease susceptibility. *PLoS One.* 7(7):e41361. doi: 10.1371/journal.pone.0041361.

Relling, M. V., Rubnitz, J. E., Rivera, G. K., et al. (1999). High incidence of secondary brain tumours after radiotherapy and antimetabolites. *Lancet*. 354: 34-39.

Relling, M. V., Gardner, E. E., Sandborn, W. J., et al. (2011). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clin. Pharmacol. Ther.* 89(3): 387–391.

Relling, M. V., Hancock, M. L., Rivera, G. K., et al. (1999). Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *J. Natl. Cancer. Inst.* 91: 2001-2008.

Remy, C. N. (1967). Ribonucleotides and ribonucleosides as methyl acceptors for S-adenosylmethionine: (amino- and thio-)purine methyl-transferases. Incorporation of 6-amino-2-methylaminopurine into ribonucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta*. 138: 258-275.

Roberts, R. L., Garry, R. B., Bland, M. V., et al. (2008). Trinucleotide repeat variants in the promoter of the thiopurine S-methyltransferase gene of patients exhibiting ultra-high enzyme activity. *Pharmacogenet. Genomics*. 18 (5): 434-438.

Roloff, T. C., Ropers, H. H., Nuber, U. A. (2003). Comparative study of methyl-CpG-binding domain proteins. *BMC Genomics* 4 (1): 1. doi:10.1186/1471-2164-4-1. PMC 149351. PMID 12529184.

Sachse, C., Brockmoller, J., Bauer, S. and Roots, I. (1997). Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am. J. Hum. Genet.* 60: 284–295.

Salavaggione, O. E., Wang, L., Wiepert, M., Yee, V. C., Weinshilboum, R. M. (2005). Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: variant allele functional and comparative genomics. *Pharmacogenet. Genomics*. 15: 801-815.

Sasaki, T., Goto, E., Konno, Y., Hiratsuka, M., Mizugaki, M. (2006). Three novel single nucleotide polymorphisms of the human thiopurine S-methyltransferase gene in Japanese individuals. *Drug. Metab. Pharmacokinet.* 21: 332-336.

Schaeffeler, E., Eichelbaum, M., Reinisch, W., Zanger, U. M. and Schwab, M. (2006). Three novel thiopurine S-methyltransferase allelic variants (TPMT*20, *21, *22) - association with decreased enzyme function. *Hum. Mutat.* 27: 976.

Schaeffeler, E., Fischer, C., Brockmeier, D., et al. (2004). Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. *Pharmacogenetics*. 14: 407-417.

Schaeffeler, E., Stanulla, M., Greil, J., et al. (2003). A novel TPMT missense mutation associated with TPMT deficiency in a 5-year-old boy with ALL. *Leukemia*. 17: 1422-1424.

Scheuermann, T. H., Keeler, C. and Hodsdon, M. E. (2004). Consequences of binding an S-adenosylmethionine analogue on the structure and dynamics of the thiopurine methyltransferase protein backbone. *Biochemistry* 43: 12198–12209.

Schwahn, B. C., Chen, Z., Laryea, M. D., et al. (2003). Homocysteine-betaine interactions in a murine model of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *FASEB J.* 17: 512–514.

Schwartz, R., Stack, J. and Dameshek, W. (1958). Effect of 6-mercaptopurine on antibody production. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 99(1): 164-167.

Serpe, L., Calvo, P. L., Muntoni, E., et al. (2009). Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics in a large-scale healthy Italian-Caucasian population: differences in enzyme activity. *Pharmacogenomics*. 10(11): 1753-1765.

Shio, Y. and Eisenman, R. N. (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100(23): 13225–13230.

- Shilatifard**, A. (2006). Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* 75:243–269.
- Silverberg**, M. S., Satsangi, J., Ahmad, T., et al. (2005). Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can. J. Gastroenterol.* 19 Suppl. A: 5-36.
- Skrzypczak-Zielinska**, M., Borun, P., Milanowska, K., et al. (2013). High-resolution melting analysis of the TPMT gene: a study in the Polish population. *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* 17: 153-159.
- Spire-Vayron de la Moureyre**, C., Debuysere, H., Fazio, F. et al. (1999). Characterization of variable number tandem repeat region in the thiopurine S-methyltransferase gene promoter. *Pharmacogen.* 9:1 89–198.
- Spire-Vayron de la Moureyre**, C., Debuysere, H., Sabbagh, N., et al. (1998). Detection of known and new mutations in the thiopurine S-methyltransferase gene by single-strand conformation polymorphism analysis. *Hum. Mutat.* 12: 177-185.
- Szumslanski**, C. L., Honchel, R., Scott, M. C. and Weinshilboum, R. M. (1992). Human liver thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: biochemical properties, liver-erythrocyte correlation and presence of isozymes. *Pharmacogenetics.* 2(4): 148-159.
- Szumslanski**, C., Otterness, D., Her, C., et al. (1996). Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA. Cell. Biol.* 15: 17-30.
- Szyf**, M. (2009). Epigenetics, DNA Methylation, and Chromatin Modifying Drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 49: 243–263.
- Stanulla**, M, Schaeffeler, E., Flohr, T., et al. (2005). Thiopurine methyltransferase (TPMT) genotype and early treatment response to mercaptopurine in childhood acute lymphoblastic leukemia. *JAMA.* 294: 1485-1489.
- Swann**, P. F., Waters, T. R., Moulton, D. C., et al. (1996). Role of Postreplicative DNA Mismatch Repair in the Cytotoxic Action of Thioguanine. *Science.* 273: 1109-1111.
- Zavoilo**, G. B. (2004). Emerging drugs for the treatment and management of inflammatory bowel disease. *Drug and Market Dev.* Aug: 609-615.
- Zhou**, S. F., Wang, B., Yang, L. P. and Liu, J. P. (2010). Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2. *Drug Metab. Rev.* 42: 268–354.
- Tai**, H. L., Krynetski, E. Y., Schuetz, E. G., Yanishevski, Y. and Evans, W. E. (1997). Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) encoded by mutant alleles in humans (TPMT*3A, TPMT*2): mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 6444-6449.
- Tate**, P. H. and Bird, A. (1993). Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr. Biol.* 3: 226-231.
- Tay**, B. S., Lilley, R. M., Murray, A. W. and Atkinson, M. R. (1969). Inhibition of phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase from Ehrlich ascites-tumor cells by thiopurine nucleotides. *Biochem. Pharmacol.* 18: 936–938.
- Thomas**, C. W., Myhre, G. M., Tschumper, R., et al. (2005). Selective Inhibition of Inflammatory Gene Expression in Activated T Lymphocytes: A Mechanism of Immune Suppression by Thiopurines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312: 537-545.
- Tomalik-Scharte**, D., Lazar, A., Fuhr, U. and Kirchheiner, J. (2008). The clinical role of genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes. *The Pharmacogenom. J.* 8: 4–15.

- Travis, S. P., Stange, E. F., Lemann, M., et al.** (2006). European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut*. 55 Suppl. 1: i16-35.
- Ujiie, S., Sasaki, T., Mizugaki, M., Ishikawa, M. and Hiratsuka, M.** (2008). Functional characterization of 23 allelic variants of thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT*2 -*24). *Pharmacogenet. Genomics*. 18: 887-893.
- Wade, P. A., Pruss, D. and Wolffe, A. P.** (1997). Histone acetylation: chromatin in action. *Trends Biochem. Sci.* 22: 128–132.
- Weber, W. W.** (2007). *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. ISBN (Volume 1) 0-08-044514-4; pp.251-278.
- Weinshilboum, R.** (1989a). Thiol S-methyltransferases, I: Biochemistry In: *Sulphur-containing Drugs and Related Organic Compounds: Chemistry, Biochemistry and Toxicology*, Vol. 2 parts A and B, ed. L.A. Damani (Ellis Horwood Limited, Chichester, UK). p. 121-142.
- Weinshilboum, R. M.** (2006). *Pharmacogenomics: Catechol O-Methyltransferase to Thiopurine S-Methyltransferase*. Cellular and Molecular Neurobiology © Springer Science+Business Media, Inc. 10.1007/s10571-006-9095-z.
- Weinshilboum, R. M. and Sladek, S. L.** (1980). Mercaptopurine Pharmacogenetics : Monogenic Inheritance of Erythrocyte Thiopurine Methyltransferase Activity. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 651-662.
- Weinshilboum, R. M., Raymond, F., Pazmiño, P.** (1978). Human erythrocyte thiopurine methyltransferase: Radiochemical Microassay and biochemical properties. *Clinica. Chimia. Acta.* 85: 323-333.
- Vidali, G., Ferrari, N. and Pfeffer, U.** (1988). Histone acetylation: a step in gene activation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 231: 583–596.
- Wolffe, A. P. and Matzke, M. A.** (1999). Epigenetics: regulation through repression. *Science* 286: 481–486.
- Woodson, L. C. and Weinshilboum, R. M.** (1983). Human kidney thiopurine methyltransferase. Purification and biochemical properties. *Biochem. Pharmacol.* 32: 819-826.
- Woodson, L. C., Dunnette, J. H. and Weinshilboum, R. M.** (1982). Pharmacogenetics of human thiopurine methyltransferase: kidney–erythrocyte correlation and immunotitration studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 222: 174–181.
- Woodson, L. C., Maus, T. P., Reiter, C. and Weinshilboum, R. M.** (1981). Rat thiopurine methyltransferase: regulation by testosterone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 218(3): 734-738.
- Wu, H., Horton, J. R., Battaile, K., et al.** (2007). Structural Basis of Allele Variation of Human Thiopurine-S-Methyltransferase. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*. 67: 198-208.
- Yan, L., Zhang, S., Eiff, B. et al.** (2000). Thiopurine methyltransferase polymorphic tandem repeat: genotype–phenotype correlation analysis. *Clin. Pharmacol. Ther.* 68(2): 210–219.
- Yang, A. S., Jones, P. A. and Shibata, A.** (1996). The mutational burden of 5-methylcytosine. In: Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD, eds. *Epigenetic mechanisms of gene regulation*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996: 77–94.
- Yates, C. R., Krynetski, E. Y., Loennechen, T., et al.** (1997). Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann. Intern. Med.* 126: 608-614.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<http://www.cypalleles.ki.se/>

<http://bio3400.nicerweb.com/>

<http://www.r-project.org/>

<http://www.tlu.ee/~kairio/failid/konspekt2.pdf>

LISAD

Lisa 1

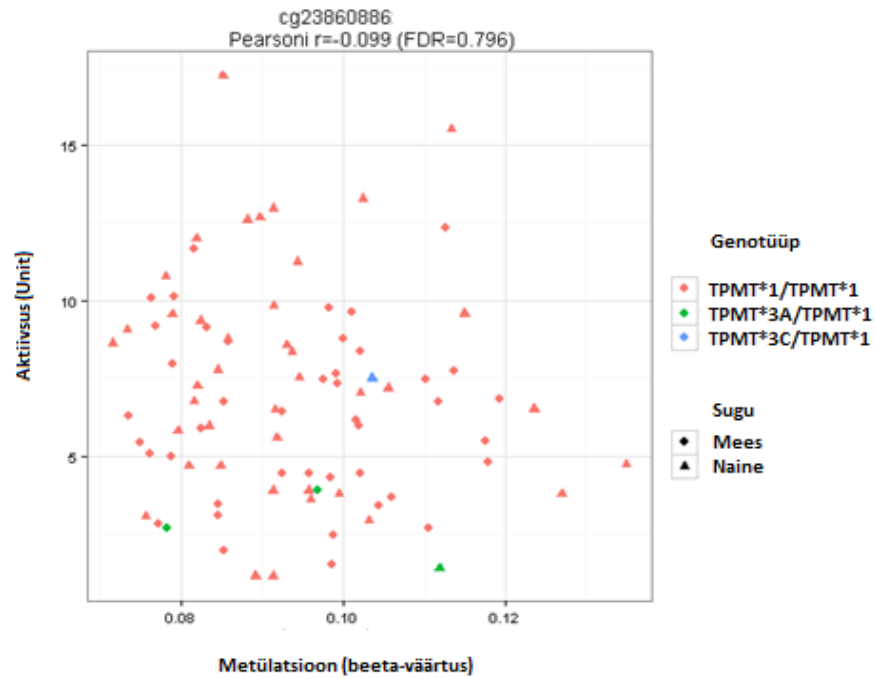
Tabel 1 TPMT 36 polümorfse alleeli kirjeldus.

| Alleel | Nukleotiidne muutus | Asukoht | Aminohappe muutus | Kirjeldus | Viited |
|---------------|----------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|--|--|
| <i>TPMT*1</i> | Metsiktüüpi (<i>wild-type</i>) | | | metsiktüüpi, normaalne TPMT aktiivsus. | |
| TPMT*1A | -178C>T | I (5'UTR) | | ei mõjuta aktiivsust. | Spire-Vayron de la Moureyre jt., 1998. |
| TPMT*1S | 474T>C | VII | Ile158Ile | Vaikiv mutatsioon, puudub seos ensüümiaktiivsusega. | Yates jt., 1997. |
| TPMT*2 | 238G>C | V | Ala80Pro | mRNA tase on sarnane metsiktüübile, kuid ensüümiaktiivsus 100 korda madalam. aminohappe vahetus muudab valgu tertsiaarstruktuuri (valk on ebastabiilne ja degradeerub kiiresti). | Krynetski jt., 1995; Tai jt. 1997; Ujiie jt., 2008 |
| TPMT*3A | 460G>A 719A>G | VII X | Ala154Thr Tyr240Cys | TPMT mRNA tase on sarnane metsiktüübile, kuid valgu tase on 400 korda madalam. Aktiivsus puudub. Valk degradeerub kiiresti. | Krynetski jt., 1995; Tai jt., 1997; Szumlanski jt., 1996 |
| TPMT*3B | 460G>A | VII | Ala154Thr | Aktiivsus 9 korda madalam. Haruldane polümorfism. Valk degradeerub kiiresti. | Krynetski jt., 1995; Tai jt., 1997; Szumlanski jt., 1996 |
| TPMT*3C | 719A>G | X | Tyr240Cys | Aktiivsus 1,4 korda madalam. Valk degradeerub kiiresti. | Yates jt., 1997; Tai jt., 1997; Otterness jt., 1997 |
| TPMT*3D | 292G>T 460G>A 719A>G | V VII X | Glu98Stop Ala154Thr Tyr240Cys | Madal ensüümiaktiivsus. | Spire-Vayron de la Moureyre jt., 1998; Otterness jt., 1997 |
| TPMT*4 | 626-1G>A | Intron IX/ ekson X | | Tekitab vigu splaissingus. Esimene seda tüüpi TPMT alleel, millel leiti seos madala ensüümiaktiivsusega. | Spire-Vayron de la Moureyre jt., 1998; Otterness jt., 1997 |

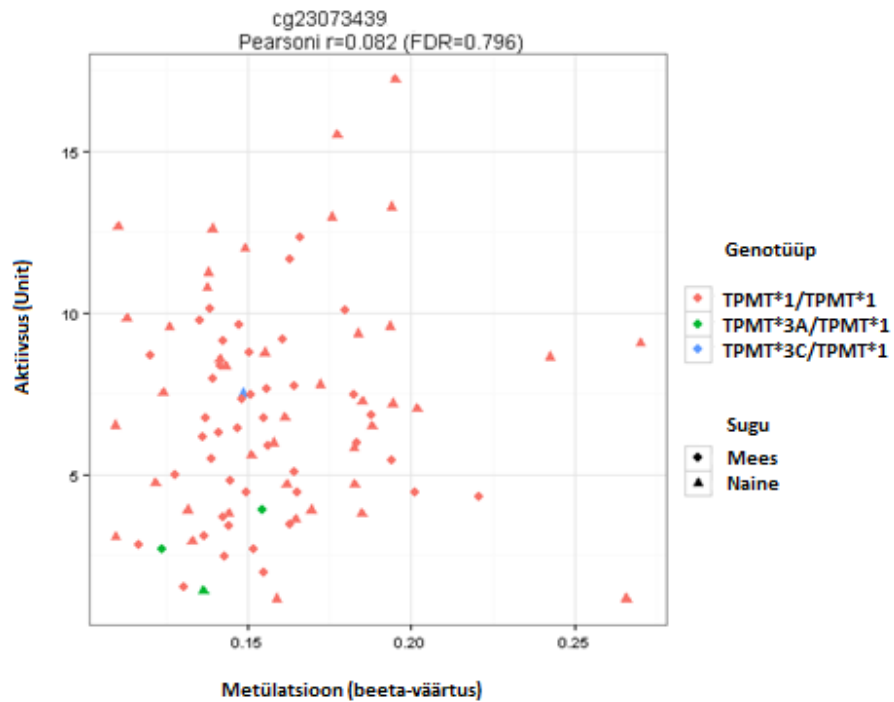
| | | | | | |
|---------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------|---|--|
| TPMT*5 | 146T>C | IV | Leu49Ser | Ensüümiaktiivsus puudub ning oluliselt madalam valgu ekspressioonitase. | Spire-Vayron de la Moureyre jt., 1998; Ujiie jt., 2008; Salavaggione jt., 2005 |
| TPMT*6 | 539A>T | VIII | Tyr180Phe | Arvatakse põhjustavat madalat ensüümiaktiivsust. | Spire-Vayron de la Moureyre jt., 1998; Otterness jt., 1997 |
| TPMT*7 | 681T>G | X | His227Glu | Missenssmutatsioon 10. Eksonis, mille tagajärjel tekib mitte funktsioneeriv alleel. | Spire-Vayron de la Moureyre jt., 1998; Ujiie jt., 2008; Salavaggione jt., 2005 |
| TPMT*8 | 644G>A | X | Arg215His | Keskmise tasemega ensüümiaktiivsus. | Hon jt., 1999 |
| TPMT*9 | 356GA>C | V | Lys119Thr | Ei mõjuta oluliselt aktiivsust. | Garat jt., 2008 |
| TPMT*10 | 430G>C | VII | Gly144Arg | Missenssmutatsioon, puudub ensüümiaktiivsus. | Salavaggione jt., 2005; McLeod jt., 1993 |
| TPMT*11 | 395G>A | VI | Cys132Tyr | Puudub ensüümiaktiivsus. | Schaeffeler jt., 2003 |
| TPMT*12 | 374C>T | VI | Ser125Leu | Missenssmutatsioon, madalam valgu ekspressioonitase. | Ujiie jt., 2008; Hamdan-Khalil jt., 2003 |
| TPMT*13 | 83A>T | III | Glu28Val | Missenssmutatsioon. | Hamdan-Khalil jt., 2003 |
| TPMT*14 | 1A>G | III | Met1Val | Madalam valgu ekspressioonitase ja ensümaatiline aktiivsus. | Ujiie jt., 2008; Lindqvist jt., 2004 |
| TPMT*15 | G>A splaissingu ühendussaidis | Intron VI/ ekson VIII | | Splaissingu defekt 7. intronis põhjustab ensüümiaktiivsuse languse. | Lindqvist jt., 2004 |
| TPMT*16 | 488G>A | VII | Arg163His | Kolm korda madalam kliirensi väärtus. | Hamdan-Khalil jt., 2005; Schaeffeler jt., 2004 |
| TPMT*17 | 124C>G | III | Gln42Glu | Ensüümiaktiivsus madalam. | Schaeffeler jt., 2004 |
| TPMT*18 | 211G>A | IV | Gly71Arg | Madalam valgu ekspressioonitase. | Schaeffeler jt., 2004 |
| TPMT*19 | 365A>C | V | Lys122Thr | Metsiktüübiga võrreldes ei ole ensüümiaktiivsus oluliselt madalam. | Hamdan-Khalil jt., 2005 |

| | | | | | |
|---------|---------|-----------|-----------|---|--------------------------------|
| TPMT*20 | 712A>G | X | Lys238GLU | Ensüümiaktiivsus langenud. | Schaeffeler jt., 2006 |
| TPMT*21 | 205C>G | IV | Leu69Val | Madal ensüümiaktiivsus. | Schaeffeler jt., 2006 |
| TPMT*22 | 488G>C | VII | Arg163Pro | Madal valgu ekspressioonitase ja ensüümiaktiivsus. | Schaeffeler jt., 2006 |
| TPMT*23 | 500G>C | VIII | Ala167Gly | Ensüümiaktiivsus praktiliselt puudub. | Lindqvist jt., 2007 |
| TPMT*24 | 537G>T | VIII | Gln179His | Missenssmutatsioon, ei mõjuta aktiivsust. | Garat jt., 2008 |
| TPMT*25 | 634T>C | X | Cys212Arg | Missenssmutatsioon. | Garat jt., 2008 |
| TPMT*26 | 622T>C | IX | Phe208Leu | Ensüümiaktiivsus langenud. | Kham jt., 2009 |
| TPMT*27 | 319T>C | V | Tyr107Asp | Ensüümiaktiivsus langenud. | Feng jt., 2010 |
| TPMT*28 | 349C>A | V | Gly117Arg | Ensüümiaktiivsus langenud. | Landy jt., 2010 |
| TPMT*29 | 2T>C | Exon III | Met1Thr | Ensüümiaktiivsus praktiliselt puudub. | Lee jt., 2012 |
| TPMT*30 | 106G>A | III | Gly36Ser, | Ensüümiaktiivsus langenud. Valk degradeerub kiiresti. | Sasaki jt., 2006 |
| TPMT*31 | 611T>C | Exon IX | Ile204Thr | Keskmine ensüümiaktiivsus. Valk degradeerub kiiresti. | Appell jt., 2010 |
| TPMT*32 | 340G>A | Exon V | Glu114Lys | Võib põhjustada ensüümiaktiivsuse langust. | Lennard jt., 2012 |
| TPMT*33 | 487C>T | Exon VII | Arg163Cys | Võib põhjustada ensüümiaktiivsuse langust. | Lennard jt., 2012 |
| TPMT*34 | 244C>T | Exon V | Arg82Trp | Võib põhjustada ensüümiaktiivsuse langust. | Lennard jt., 2012 |
| TPMT*35 | 200T>C3 | Exon III | Phe67Ser | Võib põhjustada ensüümiaktiivsuse langust. | Skrzypczak-Zielinska jt., 2013 |
| TPMT*36 | 595G>A3 | Exon VIII | Val199Ile | Võib põhjustada ensüümiaktiivsuse langust. | Skrzypczak-Zielinska jt., 2013 |

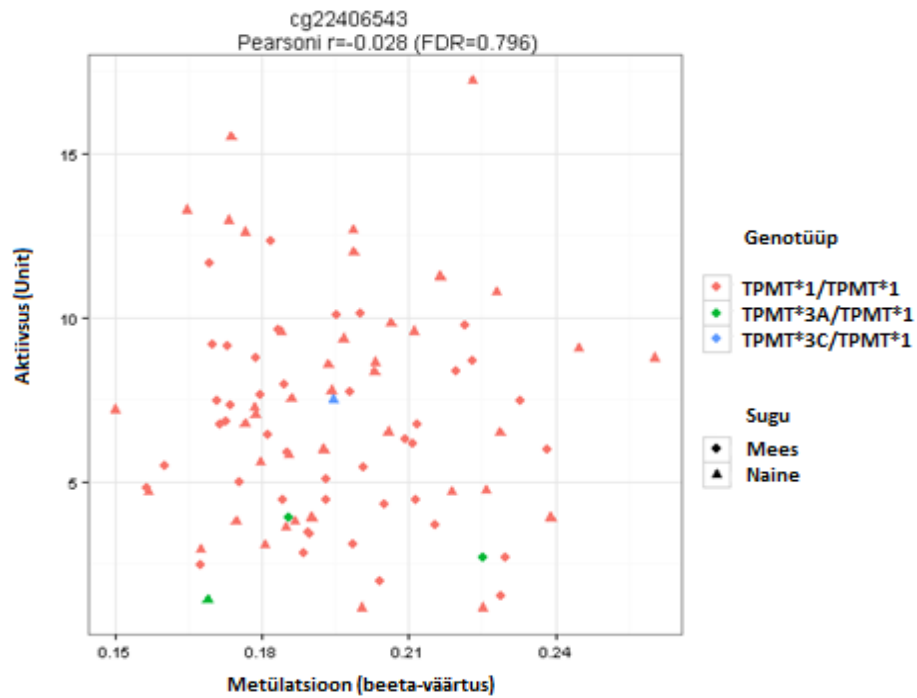
Lisa 2



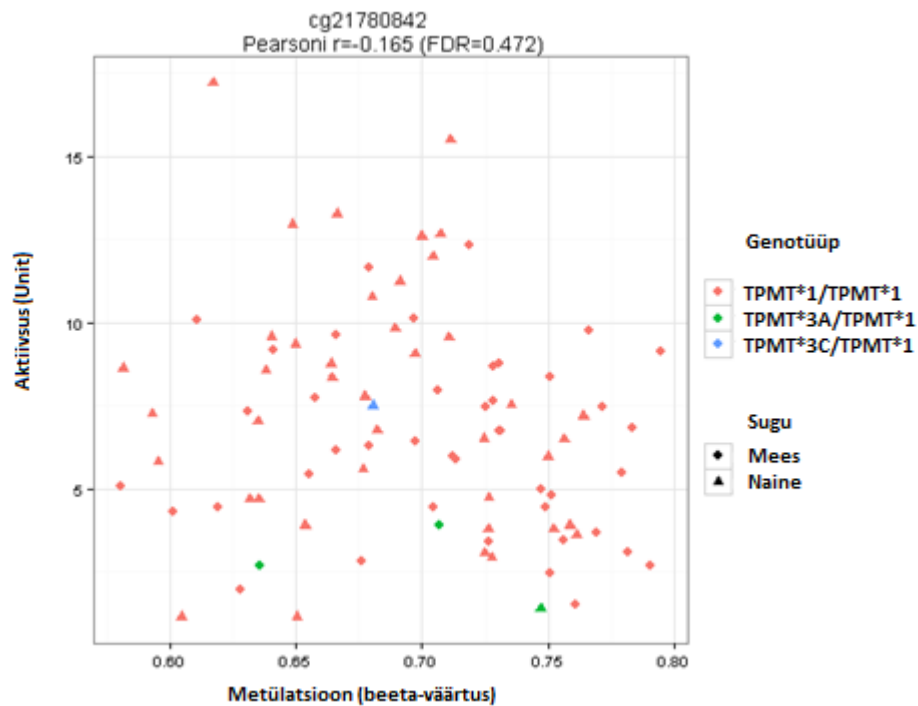
Joonis 1. CpG sait cg23860886 metülatsioonitase ja ensüümiaktiivsuse hajumisdiagramm. Joonisel on näha meeste ja naiste TPMT aktiivsused, genotüübid ning vastava CpG saidi metülatsioonitase.



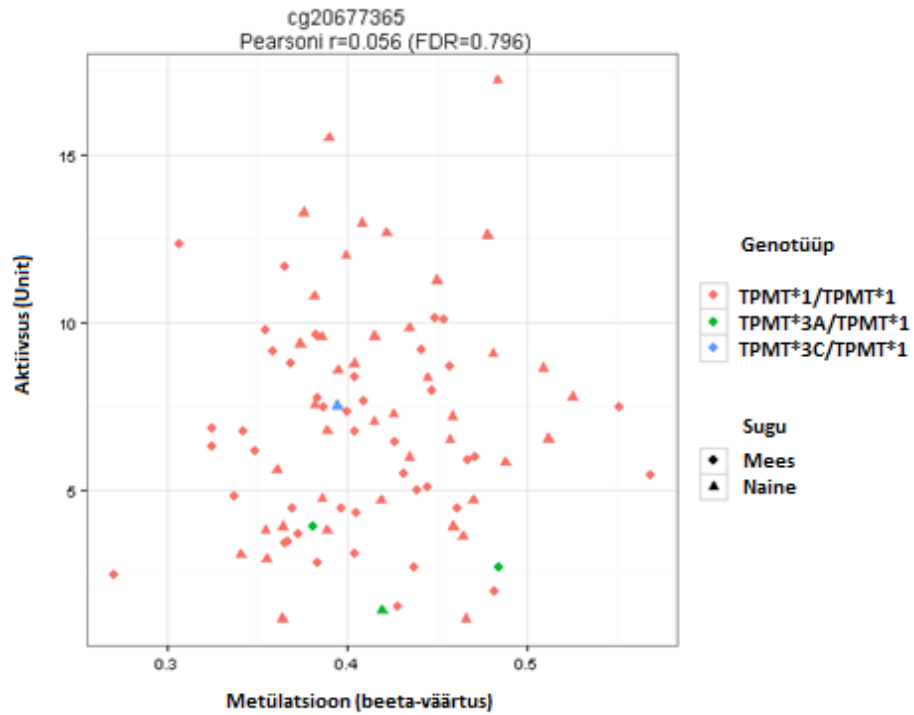
Joonis 2. CpG sait cg23073439 metülatsioonitase ja ensüümiaktiivsuse hajumisdiagramm. Joonisel on näha meeste ja naiste TPMT aktiivsused, genotüübid ning vastava CpG saidi metülatsioonitase.



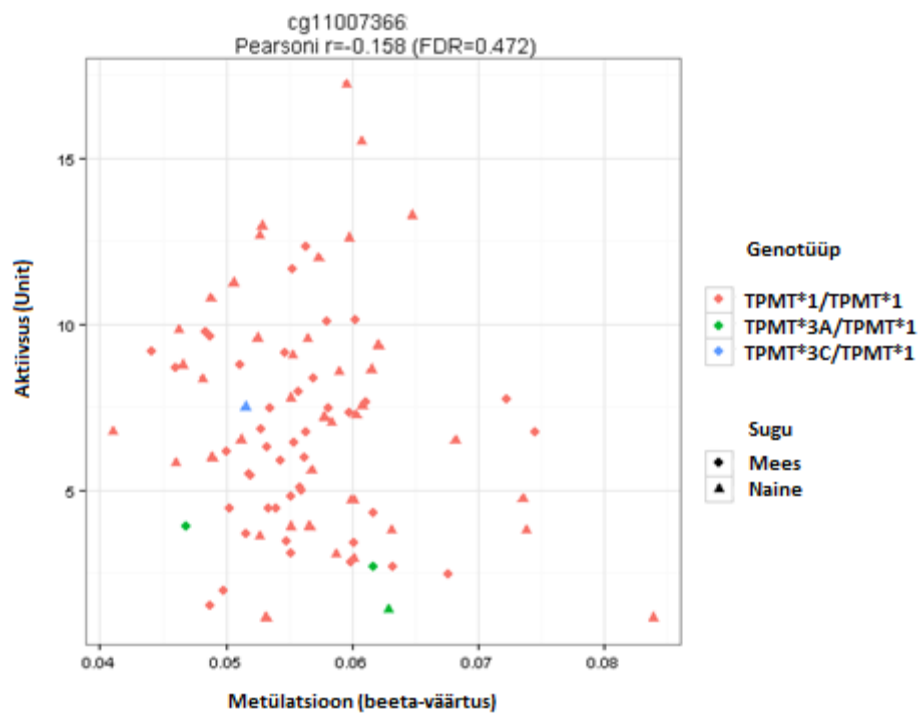
Joonis 3. CpG sait cg22406543 metülatsioonitase ja ensüümiaktiivsuse hajumisdiagramm. Joonisel on näha meeste ja naiste TPMT aktiivsused, genotüübid ning vastava CpG saidi metülatsioonitase.



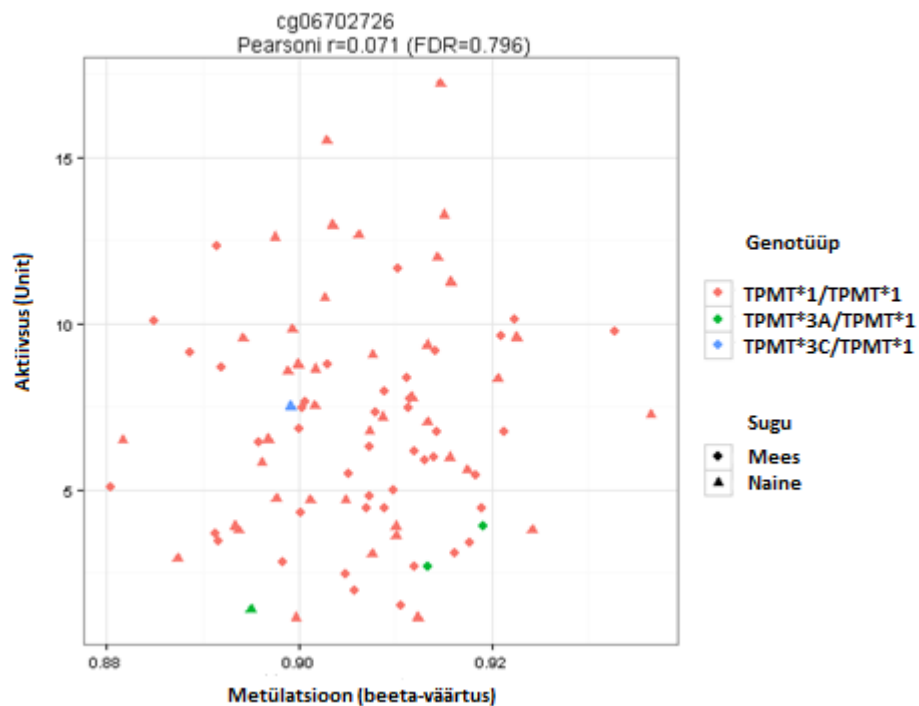
Joonis 4. CpG sait cg21780842 metülatsioonitase ja ensüümiaktiivsuse hajumisdiagramm. Joonisel on näha meeste ja naiste TPMT aktiivsused, genotüübid ning vastava CpG saidi metülatsioonitase.



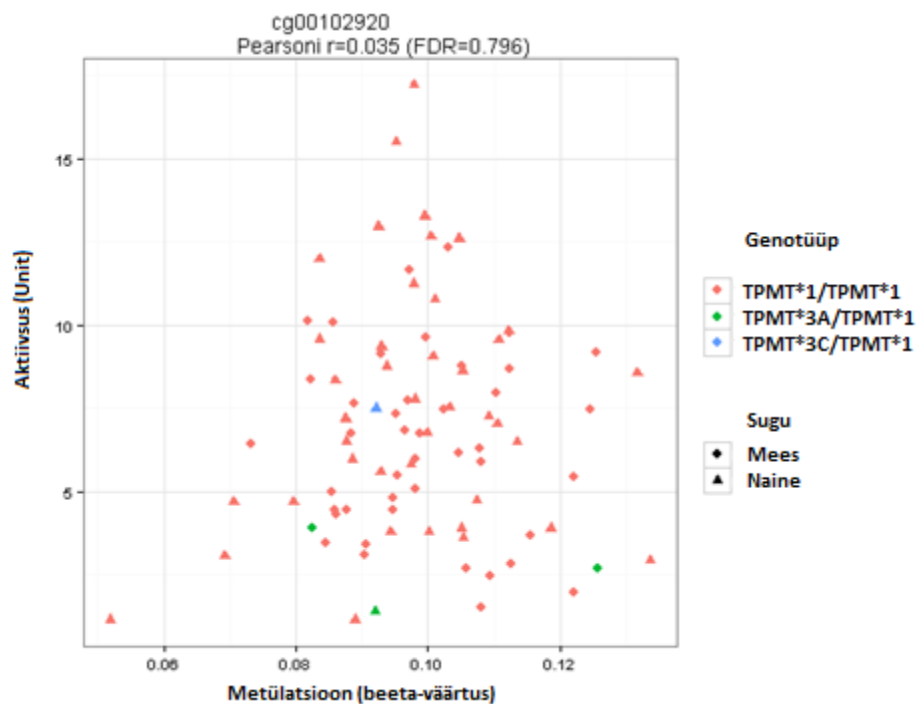
Joonis 5. CpG sait cg20677365 metülatsioonitase ja ensüümiaktiivsuse hajumisdiagramm. Joonisel on näha meeste ja naiste TPMT aktiivsused, genotüübid ning vastava CpG saidi metülatsioonitase.



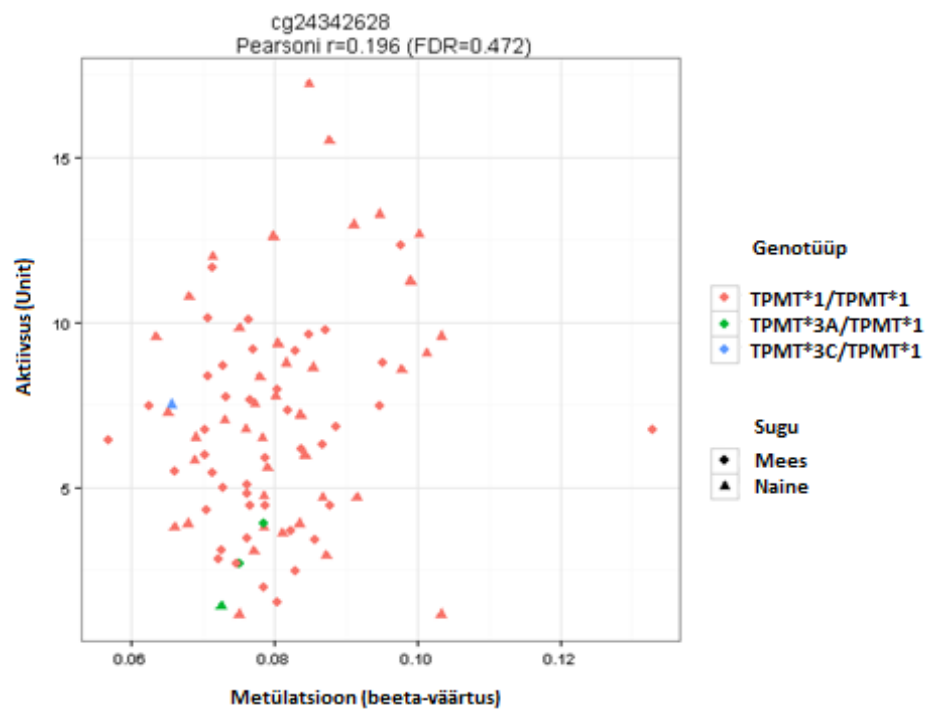
Joonis 6. CpG sait cg11007366 metülatsioonitase ja ensüümiaktiivsuse hajumisdiagramm. Joonisel on näha meeste ja naiste TPMT aktiivsused, genotüübid ning vastava CpG saidi metülatsioonitase.



Joonis 7. CpG sait cg06702726 metülatsioonitase ja ensüümiaktiivsuse hajumisdiagramm. Joonisel on näha meeste ja naiste TPMT aktiivsused, genotüübid ning vastava CpG saidi metülatsioonitase.



Joonis 8. CpG sait cg00102920 metülatsioonitase ja ensüümiaktiivsuse hajumisdiagramm. Joonisel on näha meeste ja naiste TPMT aktiivsused, genotüübid ning vastava CpG saidi metülatsioonitase.



Joonis 9. CpG sait cg24342628 metülatsioonitase ja ensüümiaktiivsuse hajumisdiagramm. Joonisel on näha meeste ja naiste TPMT aktiivsused, genotüübid ning vastava CpG saidi metülatsioonitase.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Mari-Liis Reim (sünnikuupäev: 22.06.1989)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
“Inimese tiopuriinmetüültransferaasi aktiivsust mõjutavad faktorid maksas”, mille juhendaja on Riin Tamm, Lili Milani ja Andres Metspalu.
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **22.06.2014** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2013